

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

BIOGENÈSE DE LA TÉLOMÉRASE CHEZ L'HUMAIN

THÈSE  
PRÉSENTÉE  
COMME EXIGENCE PARTIELLE  
DU DOCTORAT EN BIOLOGIE

PAR  
CHRISTIAN TRAHAN

AOÛT 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL  
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

*« DNA neither cares nor knows. DNA just is. And we dance to its music. »*

Richard Dawkins

*« Almost all aspects of life are engineered at the molecular level, and without understanding molecules we can only have a very sketchy understanding of life itself. »*

Francis Crick

*« Strive not to be a success, but rather to be of value. »*

Albert Einstein

## DÉDICACE ET REMERCIEMENTS

Je dédie cette thèse et les efforts qui l'ont accompagnée à toutes les personnes atteintes de dyskératose congénitale, une pathologie qui est malheureusement trop rare pour être investiguée par l'industrie pharmaceutique. La compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la maladie et l'élaboration de traitements reposent donc essentiellement sur les laboratoires de recherche clinique et de recherche fondamentale. Je remercie donc principalement le Dr François Dragon pour m'avoir permis de réaliser cette thèse dans son laboratoire, et pour m'avoir soutenu dans mes démarches expérimentales et m'avoir accordé toute sa confiance.

Très jeune, mes parents m'ont offert un microscope (un jouet bien sur) avec une trousse de pseudo-chimie avec lesquels j'ai eu bien du plaisir. Je m'imaginais déjà plus tard comme un scientifique dans un laboratoire. Ça parle au diable (incroyable)! Je les remercie de m'avoir encouragé et supporté du mieux qu'ils ont pu au cours de mes études. Je remercie particulièrement ma conjointe Fan Ye, cette femme extraordinaire qui fut plus que compréhensive et patiente face aux longues heures investies tout au long de mes études doctorales.

Je suis d'une éternelle gratitude envers Yves Henry (Université de Toulouse) pour ses généreux dons d'anticorps anti-NAF1, lesquels ont rendu cette thèse possible. Merci Yves ! Merci à Caroline Martel, Ahmed Hossain et Céline Bontemps pour le clonage de certains cDNA, ainsi qu'à Sahar Soltanieh, Vincent Lemay et Martin Lapensée pour leur soutien moral. Je remercie aussi Amandine Vargas et son directeur Benoit Barbeau pour le don de cellules BeWo et l'utilisation du microporateur de cellules.

Je remercie Chantal Autexier (Institut Lady Davis à Montréal), Gabriele Varani et Steve Reichow (Université de Washington) pour leur lecture critique de manuscrits avant leur soumission. Je remercie finalement les membres de mon jury de thèse pour le temps qu'ils ont consacré à lire et évaluer cette thèse.

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xi
RESUME .....	xii
PROBLÉMATIQUE.....	xiv
CHAPITRE I	
ÉTAT DES CONNAISSANCES.....	1
1.1 Dyskératose congénitale .....	1
1.1.1 Manifestations cliniques .....	1
1.1.2 Diversité génétique de la DC.....	3
1.2 Introduction aux télomères .....	7
1.2.1 ADN télomérique.....	7
1.2.2 Télomère et capuchon télomérique.....	9
1.2.3 Érosion des télomères et sénescence .....	10
1.2.4 Allongement des télomères par la télomérase. ....	15
1.3 snoRNA .....	15
1.3.1 Structure et fonction des snoRNA .....	17
1.4 scaRNA et ARN de la télomérase. ....	21
1.5 Protéines communes aux s(no)RNP C/D.....	23
1.5.1 Snu13p/15.5K/L7Ae.....	23
1.5.2 NOP56/NOP58/Nop5 .....	25
1.5.3 Fibrillarine .....	25
1.5.4 s(no)RNP C/D.....	26
1.6 Protéines communes aux snoRNP H/ACA.....	27
1.6.1 Dyskérine (Cbf5, NAP57) .....	27
1.6.2 NHP2 (L7Ae).....	30
1.6.3 NOP10 .....	30

1.6.4	GAR1 .....	31
1.6.5	s(no)RNP H/ACA .....	31
1.7	scaRNP et télomérase .....	33
1.7.1	Autres protéines associées à la hTR .....	33
1.8	Autres protéines communes aux RNP C/D et H/ACA .....	37
1.8.1	Pontine et Reptine .....	37
1.8.2	Nopp140.....	37
1.9	Protéines communes aux snRNP et/ou aux scaRNP H/ACA .....	38
1.9.1	Complexes SMN et Sm.....	38
1.9.2	WDR79 .....	40
1.10	Assemblage co-transcriptionnel des RNP H/ACA et C/D eucaryotiques .....	40
	HYPOTHÈSES .....	43
	OBJECTIFS .....	43
	MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE.....	44

## CHAPITRE II

DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME IN VITRO DESTINÉ À ANALYSER  
L'ASSEMBLAGE DE PRÉ-RNP H/ACA, ET ANALYSE DE L'EFFET DE MUTATIONS  
DANS LE DOMAINE H/ACA DE HTR SUR SON ASSEMBLAGE EN PRÉ-RNP. ....45

AVANT PROPOS.....45

Dyskeratosis congenita mutations in the H/ACA domain of human telomerase RNA affect  
its assembly into a pre-RNP.....46

2.1 Abstract.....47

2.2 Introduction.....48

2.3 Results and Discussion .....
 51 |

2.3.1 The precursor complex of human H/ACA proteins assembles correctly in RRL  
.....51

2.3.2 H/ACA proteins of the pre-RNP assemble specifically on the H/ACA domain  
of hTR.....52

2.3.3 NAF1 assembly on the H/ACA domain of hTR is mediated by the core trimer  
.....53

2.3.4 The Cajal body localization signal is not required for pre-RNP assembly.....55

2.3.5	DC mutations in the H/ACA domain of hTR impair pre-RNP assembly.....	56
2.4	Materials and Methods .....	58
2.4.1	DNA constructs.....	58
2.4.2	In vitro RNA synthesis .....	59
2.4.3	In vitro protein synthesis.....	60
2.4.4	RNP assembly .....	60
2.4.5	Immunoprecipitations .....	60
2.5	Acknowledgments .....	61
2.6	Figure legends.....	62
2.7	Figures .....	64

### CHAPITRE III

#### ANALYSE DE L'EFFET DES MUTATIONS ASSOCIÉES À LA DC DANS LES PROTÉINES DYSKÉRINE, NHP2 ET NOP10 SUR L'ASSEMBLAGE DE PRÉ-RNP H/ACA .....

68

#### AVANT PROPOS.....

68

#### Effects of dyskeratosis congenita mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on assembly of H/ACA pre-RNPs .....

69

#### 3.1 Abstract.....

70

#### 3.2 Introduction.....

71

#### 3.3 Results.....

74

##### 3.3.1 DC mutations in dyskerin do not markedly affect pre-RNP assembly .....

74

##### 3.3.2 DC-linked NHP2 mutations impair protein tetramer formation.....

76

##### 3.3.3 Mutation R34W in NOP10 does not impair pre-RNP assembly of miRNA- encoding sno/scaRNAs .....

77

##### 3.3.4 In silico modeling of 3D structures.....

77

#### 3.4 Discussion.....

79

##### 3.4.1 DC mutations in dyskerin .....

79

##### 3.4.2 DC mutations in NHP2 .....

80

##### 3.4.3 DC mutation R34W in NOP10 .....

81

##### 3.4.4 Significance to DC.....

83

3.5	Materials and Methods .....	85
3.5.1	DNA constructs.....	85
3.5.2	<i>In vitro</i> transcription of radiolabeled RNAs .....	86
3.5.3	<i>In vitro</i> protein synthesis, RNP assembly and IPs .....	87
3.5.4	<i>In silico</i> structure predictions and multiple sequence alignments .....	87
3.6	Acknowledgments .....	87
3.7	Figure legends.....	89
3.8	Figures .....	92
CHAPITRE IV		
	ANALYSE DE L'EXTRÉMITÉ 3' DE HTR AYANT ÉTÉ MATURÉS IN VIVO.....	98
	AVANT PROPOS.....	98
	3'-end maturation of human telomerase RNA precursor.....	99
4.1	Abstract.....	100
4.2	Introduction.....	101
4.3	Results and Discussion .....	104
4.3.1	3'-end processing of hTR is unaffected by the aplastic anemia mutation G450A.....	104
4.3.2	Impairment of RNP assembly and RNA degradation.....	105
4.3.3	Oligoadenylation of nearly mature endogenous hTR. ....	106
4.4	Conclusion .....	107
4.5	Materials and methods.....	108
4.5.1	DNA constructs.....	108
4.5.2	Cell culture.....	108
4.5.3	Transfections.....	108
4.5.4	RNA preparation.....	109
4.5.5	3' RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends (3' RLM-RACE) .....	109
4.6	Acknowledgement .....	110
4.7	Tableaux .....	111
4.8	Figure legends.....	113



4.9	Figures .....	114
CHAPITRE V		
	DISCUSSION .....	116
5.1	Système de reconstitution in vitro .....	116
5.2	Implications pour la dyskératose congénitale .....	118
5.3	Mise à profit du système de reconstitution de pré-RNP .....	124
5.4	Transposition de nos études de reconstitution in vivo .....	126
5.5	Fonction de l'oligoadénylation .....	128
5.6	Transcrit primaire de hTR et éléments de maturation .....	129
	CONCLUSION GÉNÉRALE .....	130
	RÉFÉRENCES .....	131

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1:</b> Photographies illustrant la triade de désordres mucocutanés associés à la dyskératose congénitale.....	2
<b>Figure 1.2:</b> Schéma du DNA télomérique d'humain. ....	8
<b>Figure 1.3:</b> Représentation schématique du DNA télomérique associé aux six protéines du complexe «shelterin».....	10
<b>Figure 1.4:</b> Problème de réplication et érosion des télomères. ....	11
<b>Figure 1.5:</b> Schéma de l'hypothèse de la sénescence cellulaire.....	13
<b>Figure 1.6:</b> Schéma de l'allongement des télomères par la télomérase. ....	16
<b>Figure 1.7:</b> Modifications post-transcriptionnelles effectuées par les snoRNP. ....	18
<b>Figure 1.8:</b> Structure et mode d'action des snoRNA guides.....	19
<b>Figure 1.9:</b> Schéma de la structure des scaRNA d'humain. ....	22
<b>Figure 1.10:</b> Modèle de la structure secondaire de hTR. ....	24
<b>Figure 1.11:</b> Divergence des sRNP et snoRNP C/D. ....	28
<b>Figure 1.12:</b> Schéma des domaines des protéines communes aux RNP H/ACA et C/D....	29
<b>Figure 1.13:</b> Structure cristalline d'une sRNP d'archéobactérie. ....	32
<b>Figure 2.1:</b> Schematic secondary structure of the H/ACA domain of hTR. ....	64
<b>Figure 2.2:</b> The tetramer NAF1-dyskerin-NOP10-NHP2 assembles specifically with hTR204 .....	65
<b>Figure 2.3:</b> Binding of NAF1 to hTR204 requires the trimer dyskerin/NOP10/NHP2.....	66
<b>Figure 2.4:</b> Some mutations in hTR204 impair pre-RNP assembly. ....	67
<b>Figure 3.1:</b> Formation of protein tetramers with dyskerin mutants. ....	92
<b>Figure 3.2:</b> Formation of pre-RNPs with dyskerin mutants.....	93
<b>Figure 3.3:</b> Some DC mutations in NHP2 affect protein tetramer formation. ....	94
<b>Figure 3.4:</b> Mutation R34W in NOP10 blocks pre-RNP formation. ....	95
<b>Figure 3.5:</b> <i>In silico</i> modeling of DC mutants. ....	96
<b>Figure 3.6:</b> Multiple alignments of NHP2 and NOP10 proteins from various organisms...	97
<b>Figure 4.1:</b> Schematic representation of the H/ACA-like domain of hTR. ....	114
<b>Figure 4.2:</b> Mutation of the ACA motif generates hTR molecules with variable 3'-ends. ....	115

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.1:</b>	Mutations dans les gènes associés à la DC et autres pathologies qui y sont reliées, ainsi que leurs modes de transmission. ....	4
<b>Tableau 4.1:</b>	3'-end of hTR transcripts expressed from WT-hTR-500 and G450A-hTR-500 in VA-13 cells.....	111
<b>Tableau 4.2:</b>	3'-end of endogenous hTR transcripts processed in HeLa and BeWo cells. ....	112

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa	Acide aminé
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique
b	Base d'ADN
cDNA	ADN complémentaire
DC	Dyskératose congénitale
kpb	Kilo paires de bases
mRNA	ARN messenger
miRNA	Micro ARN
nt	Nucléotide
pb	Paire de bases
pré-rRNA	ARN ribosomique précurseur
pré-RNP	RNP précurseur
RNP	Ribonucléoprotéine
RRL	Lysat de réticulocytes de lapin
sRNA	Petit ARN d'archéobactérie
rRNA	ARN ribosomique
sRNP	Petite RNP d'archéobactérie
scaRNA	Petit ARN des corps de Cajal
scaRNP	Petite RNP des corps de Cajal
siRNA	Petit ARN interférant
snRNA	Petit ARN nucléaire
snoRNA	Petit ARN nucléolaire
snoRNP	Petite RNP nucléolaire
tRNA	ARN de transfert

## RESUME

La dyskératose congénitale (DC) est une pathologie principalement caractérisée par une triade de phénotypes mucocutanés. Bien que les symptômes mucocutanés soit présents chez la majorité des sujets atteints, une multitude d'autres désordres qui varient d'un individu à l'autre peuvent également être observés. D'après la fonction des six gènes contenant des mutations associées à la DC identifiées à ce jour, il est considéré que la pathologie et les désordres qu'elle peut engendrer sont principalement causés par un défaut dans la biologie des télomères qui constituent les extrémités des chromosomes chez les eucaryotes. Cinq des six gènes identifiés codent pour des composantes de la télomérase (TERT, TERC, dyskérine, NOP10 et NHP2), une ribonucléoprotéine responsable du maintien de la longueur des télomères.

La composante ARN de la télomérase (TERC, aussi nommé hTR pour «human telomerase RNA»), et les protéines dyskérine, NOP10 et NHP2 ont cependant un autre lien qui les unit. Chez les vertébrés, la moitié 3' de l'ARN de la télomérase adopte une structure similaire aux petits ARN nucléolaires (snoRNA) et aux petits ARN des corps de Cajal (scaRNA) de la famille H/ACA. Il y a des évidences que la dyskérine (une pseudouridyne synthase), NOP10, NHP2 et le facteur d'assemblage nucléaire 1 (NAF1) forment un tétramère protéique qui est assemblé avec les transcrits H/ACA naissants de façon co-transcriptionnelle pour former des ribonucléoprotéines H/ACA précoces (pré-RNP) non-fonctionnelles. Suite à leurs maturations selon un mécanisme encore inconnu, ces particules sont principalement impliquées dans la pseudouridylation d'ARN ribosomique précurseurs (pré-rRNA) et de petits ARN nucléaires (snRNA) du spliceosome. Bien qu'aucune cible de pseudouridylation n'ait été découverte pour hTR, son domaine H/ACA est essentiel à son accumulation *in vivo*.

Nous avons tout d'abord mis au point un système *in vitro* de reconstitution et d'analyse de pré-RNP H/ACA. Ce système nous a permis d'analyser l'effet de mutations localisées dans le domaine H/ACA de hTR, dont certaines sont associées à la DC, ainsi que des mutations reliées à la DC qui sont localisées dans les protéines dyskérine, NHP2 et NOP10, sur la formation de pré-RNP H/ACA. Nous démontrons que NAF1 requiert la présence du trimère dyskérine-NOP10-NHP2 afin d'être efficacement incorporé aux pré-RNP H/ACA en général, à l'exception de U17, le seul ARN H/ACA impliqué dans le clivage d'ARN ribosomique (rRNA). Nous démontrons que la mutation C408G et la délétion  $\Delta 378-451$  associées à la DC dans le domaine H/ACA de hTR, ainsi que des mutations des boîtes H et ACA abrogent la formation de pré-RNP, ce qui engendre probablement la dégradation des transcrits de hTR non assemblés *in vivo*. Nous mettons également en évidence un défaut d'assemblage spécifique du domaine H/ACA de hTR en pré-RNP causé par la mutation la plus prévalente dans la dyskérine (A353V). Les mutations V126M et Y139H dans NHP2 causent quant à elles, une perte d'association entre NHP2 et NOP10, ce qui engendre par conséquent l'abrogation de la formation de pré-RNP avec le domaine H/ACA de hTR ainsi qu'avec les autres ARN H/ACA en général. La mutation R34W dans NOP10 n'a aucun effet sur l'assemblage du tétramère protéique, mais abroge également l'assemblage de pré-RNP

avec le domaine H/ACA de hTR et les autres ARN H/ACA en général à l'exception de ceux qui encodent des miRNA. Ces résultats indiquent qu'en plus d'affecter la biogenèse de hTR, la biogenèse de différentes populations de RNP H/ACA pourraient être affectées par des mutations dans la dyskérine, NHP2 ou NOP10. Ceci suggère que certains désordres de la DC pourraient être engendrés via les voies de biogenèse des rRNA, des snRNA, et même de certains miRNA chez des individus hébergeant certaines mutations dans ces trois protéines.

Nous démontrons finalement par 3' RLM-RACE que certains transcrits de hTR qui sont presque entièrement matures à l'extrémité 3' sont assujettis à une oligoadénylation *in vivo*. Les bases moléculaires et les implications d'une telle oligoadénylation demeurent cependant inconnues. Il pourrait s'agir d'un élément requis pour la maturation finale de l'extrémité de hTR, ou bien d'un signal de dégradation de transcrits inadéquatement maturés. Nos résultats de 3' RLM-RACE suggèrent également la présence d'élément(s) nécessaire(s) à une maturation efficace de l'extrémité 3' de hTR localisé(s) en aval de 500 pb dans la séquence 3' flanquante de hTR dans le génome. Enfin, des transcrits matures de hTR dont la boîte ACA fut mutée ne purent être observés par RLM-RACE, ce qui supporte l'hypothèse qu'en absence de formation de pré-RNP, les transcrits H/ACA naissants sont rapidement dégradés *in vivo*.

Finalement notre système *in vitro* de reconstitution et d'analyse de pré-RNP H/ACA rend maintenant possible le criblage de petites molécules qui auraient comme effet de restaurer la formation de pré-RNP H/ACA qui affectées par les mutations reliées à la DC dans le domaine H/ACA de hTR et dans les protéines dyskérine, NOP10 et NHP2. Cela permettrait d'aboutir à une thérapie personnalisée afin de traiter des sujets atteints de DC.

Mots clefs: Dyskératose congénitale, Télomérase, ribonucléoprotéines H/ACA, hTR, ARN H/ACA

## PROBLÉMATIQUE

Peu d'études moléculaires démontrant l'effet de mutations associées à la DC dans le domaine H/ACA de hTR ou même dans la dyskérine, NOP10 et NHP2 ont été réalisées à ce jour. Bien que des mutations liées à la DC dans le domaine H/ACA de hTR causent une baisse des niveaux de hTR *in vivo*, la cause de cette réduction est inconnue. De par la nature des six gènes impliqués dans la DC, il existe toujours un débat à savoir si certains désordres de la DC peuvent être causés par d'autres voies moléculaires que la voie télomérase/téломères comme la voie de synthèse de rRNA associée à la double fonction de dyskérine, NOP10 et NHP2. Et pourtant, alors que les mutations dans hTR affectent la télomérase et indirectement les télomères, ne serait-il pas logique que des mutations dans la dyskérine, NOP10 et NHP2 puissent également affecter la voie de maturation de rRNA en plus de la voie de la télomérase?<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Une revue de la littérature facilitant la compréhension des hypothèses formulées subséquemment sera tout d'abord introduite.

# CHAPITRE I

## ÉTAT DES CONNAISSANCES

### 1.1 Dyskératose congénitale

#### 1.1.1 Manifestations cliniques

La dyskératose congénitale est une pathologie rare qui fut originellement décrite en 1910 comme un désordre des muqueuses. Son diagnostic fut pendant longtemps basé sur une triade de signes cliniques : une pigmentation anormale de la peau, une dystrophie des ongles et des leucoplasies mucosales (Figure 1.1). Bien que cette triade de symptômes soit présente dans 80-90 % des sujets atteints, plusieurs autres désordres peuvent être observés. Ceux-ci incluent l'aplasie médullaire, une fibrose pulmonaire ou une vascularisation anormale des poumons, un retard mental, la perte prématurée des dents et des cheveux, le blanchiment prématuré des cheveux, des troubles hépatiques, l'ostéoporose, l'épiphora et la surdité. De façon classique, la dystrophie des ongles et la pigmentation anormale de la peau apparaissent durant la première décennie de la vie. Des tumeurs épithéliales survenant dans le tractus intestinal ou étant reliées aux leucoplasies mucosales se développent habituellement à l'adolescence. Par la suite, l'aplasie médullaire se manifeste souvent lors de la troisième décennie chez environ 85 % des patients, et serait responsable d'environ 80 % des décès (Kirwan et Dokal 2009; Vulliamy et Dokal 2008)<sup>2</sup>.

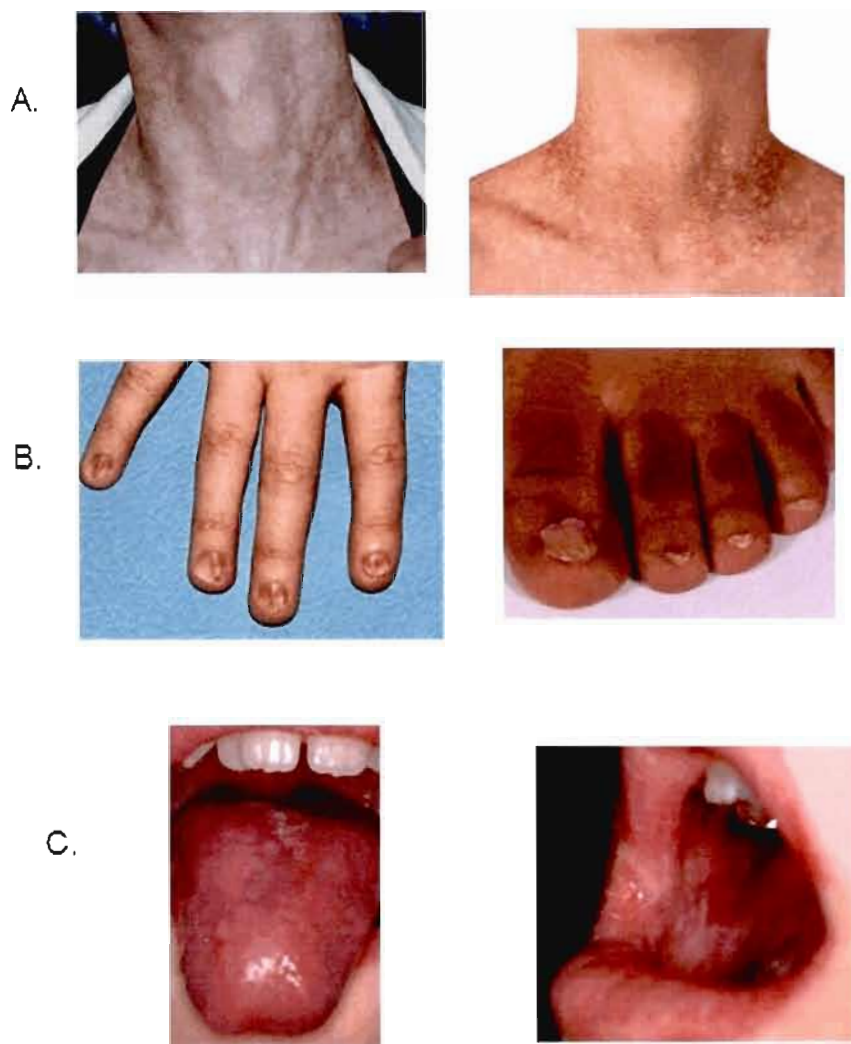
Une forme plus sévère de la DC autrement connue comme le syndrome Hoyerlaal Hreidarsson (HH), peut se manifester par un retard de croissance *in utero*, un retard de développement, une microcéphalie, une hypoplasie cérébelleuse, une immunodéficience et une anémie aplasique. Dans la plupart des cas, les sujets souffrant de HH ne survivent pas

---

<sup>2</sup> Par souci d'économie de papier, les références ne sont données qu'à la toute fin de la thèse.



assez longtemps pour développer les désordres mucocutanés associés à la DC, ou même présenter tous les symptômes du syndrome HH (Walne et Dokal 2009).



**Figure 1.1:** Photographies illustrant la triade de désordres mucocutanés associés à la dyskératose congénitale. **A)** Pigmentation anormale de la peau, **B)** dysplasie des ongles, **C)** leucoplasies orales (tiré de Savage et Alter 2009).

Étant donné la variété de désordres engendrés par la DC, son diagnostic est aujourd'hui modifié. Le diagnostic de la DC peut être fait si le patient présente un ou plusieurs traits mucocutanés caractéristiques de la DC, en combinaison avec une hypoplasie de la moelle osseuse ainsi que deux désordres somatiques (ou plus) qui sont associés à la DC (Walne et Dokal 2009).

### 1.1.2 Diversité génétique de la DC

À ce jour, des mutations dans six gènes ont été reliées à environ la moitié des cas répertoriés au registre de la dyskératose congénitale (Londres, UK). Les défauts génétiques associés au reste des cas répertoriés de la DC demeurent inconnus. Les six gènes identifiés qui sont associés à la DC sont *TERC* (5-10 %), *TERT* (5 %), *DKC1* (30 %), *NHP2* (< 2 %) *NOP10* (< 1 %) et *TINF2* (10-15 %). Le produit du gène *TINF2* fait partie du complexe «shelterin» qui protège et régule les extrémités des chromosomes linéaires eucaryotiques nommées télomères, alors que les gènes *TERC*, *TERT*, *DKC1*, *NHP2* et *NOP10* encodent des composantes de la ribonucléoprotéine (RNP) télomérase dont la fonction est d'allonger l'ADN télomérique (Tableau 1.1). Comme ces gènes ont tous une fonction dans la biologie des télomères et que des télomères critiquement courts sont communément observés chez les sujets atteints de DC, la pathologie et ses symptômes sont principalement considérés comme un problème de maintien des télomères (Kirwan et Dokal 2009; et références incluses).

Il n'y aurait aucune corrélation entre l'identité des mutations et les phénotypes ou même la gravité de la pathologie, mises à part de rares exceptions qui ségréguent avec un phénotype sévère de la pathologie. Par exemple, la mutation la plus fréquente dans la dyskératose, A353V, peut être observée chez un patient mâle de 34 ans présentant une hyperpigmentation de la peau, une dystrophie des ongles, des leucoplasies mucosales, la perte prématurée de cheveux, un taux d'hémoglobine réduit. À l'opposé, un garçon d'un an possédant la même mutation présente des signes cliniques plus sévères tels une immunodéficience, une hypoplasie cérébelleuse, un retard de développement, une anémie, une thrombocytopénie et des leucoplasies. Une sévérité accrue de la DC peut également être anticipée dans les formes héréditaires de la DC dans les individus atteints de génération en génération.

Tableau 1.1: Mutations dans les gènes associés à la DC et autres pathologies qui y sont reliées, ainsi que leurs modes de transmission.

<u>Complexes</u> Gènes (protéines)	Nombre de mutations	Types de mutations	Pathologies
<u>Télomérase</u>			
<i>TERC</i>	32	Hétérozygotes	AA, AD/AR-DC, ET, MDS, PNH, PF
<i>TERT</i> (TERT)	32	Hétérozygotes	AA, AD-DC, HH, PF
		Bialléliques	AR-DC, HH
<i>DKC1</i> (dyskérine)	54	Hémizygotes	X-DC, HH
<i>NHP2</i> (NHP2)	3	Biallélique	AR-DC
		Homozygote	AR-DC
<i>NOP10</i> (NOP10)	1	Homozygote	AR-DC
<u>«shelterin»</u>			
<i>TINF2</i> (TIN2)	18	Hétérozygote	AA, AD-DC, HH, RS

AA, anémie aplasique; AD-DC, dyskératose congénitale autosomique dominante; AR-DC, dyskératose congénitale autosomique récessive; PF, fibrose pulmonaire; ET, thrombocytopénie essentielle; MDS, syndrome myélodysplasique; PNH, hémoglobinurie paroxystique nocturne; HH, syndrome de Hoyeraal-Hreidarsson; RS, syndrome de Revesz (adapté de Walne et Dokal 2009)

(Kirwan et Dokal 2009). Ces individus ont en général des télomères plus courts que leurs parents atteints, asymptomatiques ou non, après la normalisation de la longueur selon l'âge (Vulliamy, Marrone *et al.* 2004; Vulliamy, Marrone *et al.* 2006). La sévérité de la pathologie semblerait donc plutôt corrélée avec la longueur des télomères. Plus ces derniers sont courts, plus la pathologie sera sévère.

Alors que des mutations dans ces six gènes sont impliquées dans la DC, des mutations hétérozygotes dans trois de ces six gènes ont été reliées à d'autres désordres dont les phénotypes peuvent ressembler à certains phénotypes de la DC. Des mutations dans *TERC* sont également impliquées dans des désordres sanguins (thrombocytopénie essentielle, syndrome myélodysplasique et hémoglobinurie paroxystique nocturne). D'autres mutations hétérozygotes dans *TERT* et *TERC* sont impliquées dans des anémies aplasiques et des cas de fibrose idiopathique pulmonaire (Tableau 1.1) sans autres signes de DC. Finalement des mutations dans *TINF2* sont associées au syndrome de Revesz, et ce dernier pourrait être une forme sévère de la DC caractérisée par une rétinopathie accompagnée d'autres désordres qui ressemblent à ceux rencontrés dans le syndrome HH (Kirwan et Dokal 2009; Savage, Giri *et al.* 2008).

#### 1.1.2.1 Autres liens unissant dyskérine, NOP10, NHP2 et hTR

Les protéines dyskérine, NOP10 et NHP2 partagent également une fonction dans l'assemblage et l'activité des petites RNP nucléolaires (snoRNP) et des petites RNP des corps de Cajal (scaRNP) de la famille H/ACA. Les snoRNP et les scaRNP sont respectivement assemblées avec des snoRNA et des scaRNA de classe H/ACA. Alors que les snoRNA H/ACA guident principalement des réactions de pseudouridylation de pré-rRNA, ainsi que de certains snRNA et tRNA (Bachelierie, Cavaillé et Hüttenhofer 2002), les scaRNA dirigent principalement la pseudouridylation de snRNA (Jady, Darzacq *et al.* 2003). L'ARN de la télomérase d'humain contient également un domaine ressemblant aux ARN H/ACA, et ce domaine est également assemblé en une RNP dont font partie dyskérine, NOP10 et NHP2. Le but du présent travail était d'analyser l'effet de mutations dans le domaine H/ACA de hTR, ainsi que dans les protéines dyskérine, NOP10 et NHP2 sur l'assemblage de RNP H/ACA

incluant le domaine H/ACA de hTR. Les notions associées aux RNP H/ACA nécessaires à la bonne compréhension de cette thèse seront donc introduites dans les sections suivantes.

### 1.1.2.2 Modèles murins

Étant donné la longueur des télomères murins (10-60 kpb chez les souris de laboratoire) et la courte durée de vie des souris, des souris homozygotes knockout pour l'ARN de la télomérase (mTR) sont initialement viables. Elles présentent cependant certains symptômes de la DC (une réduction de l'espérance de vie et la tendance à la formation de tumeurs) avant même que les télomères ne deviennent extrêmement courts (Blasco, Lee *et al.* 1997; Chiang, Hemann *et al.* 2004). Lorsque des délétions d'un ou des deux allèles de mTR furent pratiquées dans des souris ayant une longueur de télomères similaire à la longueur des télomères d'humains, une diminution de la prolifération cellulaire de la moelle osseuse, de l'intestin et des testicules fut observée dans les premières générations (G1 et G2) pour les souris mTR<sup>-/-</sup> et dans les générations tardives pour les souris mTR<sup>+/-</sup>. De plus, la progéniture mTR<sup>+/-</sup> provenant des générations tardives de souris mTR<sup>+/-</sup> affichaient également des défauts de prolifération des cellules germinales. Cela suggère que l'aplasie de la moelle osseuse observée chez les sujets atteints de DC est causée par des télomères extrêmement courts, une conséquence de l'haploinsuffisance de la télomérase (Hao, Armanios *et al.* 2005).

Alors que des souris homozygotes knock-out pour *DKC1* meurent au stade embryonnaire (He, Navarrete *et al.* 2002), des souris ayant une expression réduite de la dyskérine sont viables et affichent des symptômes similaires de DC (une dyskératose de la peau, une légère anémie et une tendance à la tumorigenèse) en G1 et G2. À partir de 6 mois, environ 60% des souris G1 et G2 présentent une anémie sévère et une lymphopénie. Ces symptômes seraient attribuables à une mauvaise pseudouridylation du rRNA car l'effet du raccourcissement des télomères n'apparaît qu'en G4. La moitié de ces souris développent des tumeurs durant leur vie, suggérant que la dyskérine est un suppresseur de tumeur (Ruggero, Grisendi *et al.* 2003).

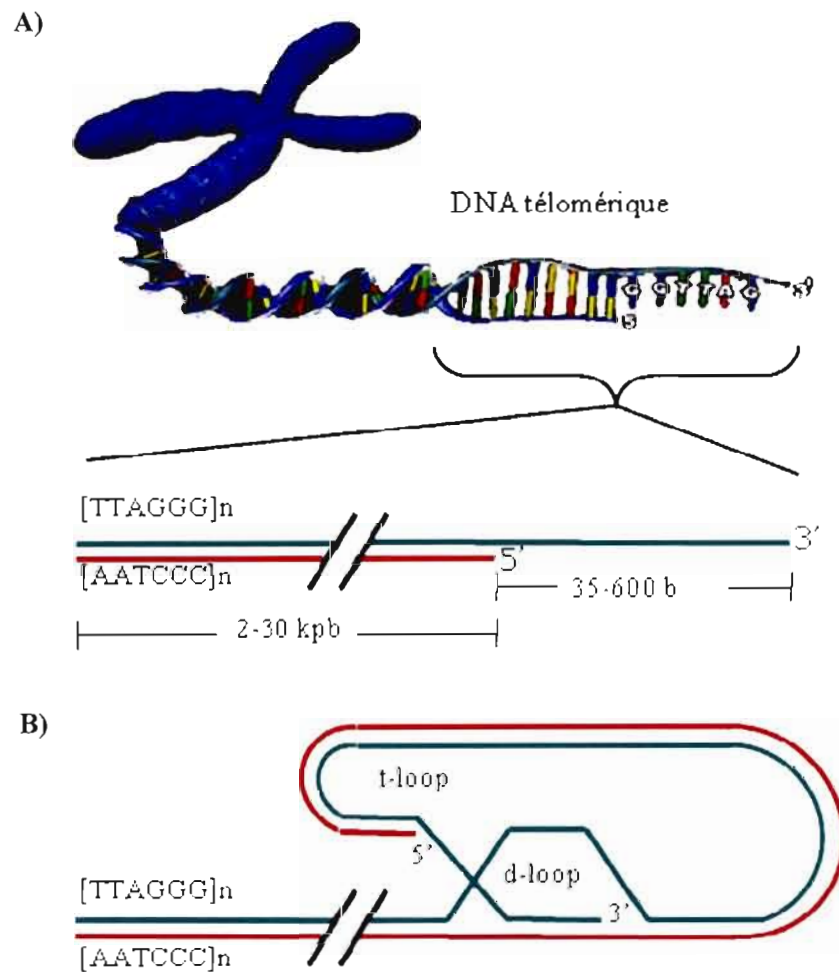
En plus d'affecter les niveaux de télomérase fonctionnelle *in vivo*, il y a d'autres évidences que des mutations dans la dyskérine introduites dans des cellules souches murines peuvent en plus engendrer une variation de l'accumulation de snoRNA H/ACA, une diminution de l'activité pseudouridine synthase et un problème de maturation des rRNA (Gu, Bessler et Mason 2008; Gu, Zhao *et al.* 2009; Mochizuki, He *et al.* 2004). Il ne serait donc pas surprenant que les mutations dans NOP10 et NHP2 associées à la DC puissent engendrer des défauts similaires. Il fut également démontré que l'un des mutants de la dyskérine exprimé dans les cellules souches murines (une délétion des acides aminés de l'extrémité C-terminale) provoque un désavantage prolifératif indépendamment de la longueur des télomères qui serait causé par l'induction de dommage à l'ADN via la voie ATM/p53 (Gu, Bessler et Mason 2008) (analogie avec la sénescence cellulaire; section 1.2.3).

## 1.2 Introduction aux télomères

### 1.2.1 ADN télomérique

Chez l'humain, l'ADN télomérique (Figure 1.2A) est composé de séquences répétées TTAGGG majoritairement retrouvées sous forme double brin qui varie entre 2 et 30 kpb (Farr, Fantes *et al.* 1991; Hanish, Yanowitz et de Lange 1994). L'extrémité du brin riche en G (extrémité 3') est protubérante et sa longueur peut varier entre 35 et 600 bases (Sfeir, Chai *et al.* 2005). En 1999, Jack Griffith et Titia de Lange ont identifié une structure ressemblant à un lasso à l'extrémité de chromosomes de mammifères (Figure 1.2B) qu'ils ont nommé boucle de télomère (t-loop). Ces structures en boucle comptent des milliers de répétitions, et les auteurs ont postulé qu'elles étaient formées par l'invasion du brin 3' protubérant dans la région double brin de l'ADN télomérique séquestrant ainsi l'extrémité 3' protubérante. L'invasion et l'hybridation du brin 3' protubérant au brin riche en C créerait une boucle de déplacement formée par le simple brin riche en G déplacé par l'invasion de l'ADN 3' protubérant (d-loop) (Griffith, Comeau *et al.* 1999).

La longueur des télomères dépend du type de cellules et de l'âge prolifératif de ces dernières. Les télomères ont une longueur d'environ 10 kpb à la naissance et raccourcissent



**Figure 1.2:** Schéma de l'ADN télomérique d'humain. **A)** L'ADN télomérique d'humain est constitué de séquences répétées TTAGGG sur une distance qui varie de 2 à 30 kpb, avec une extrémité 3' protubérante mesurant entre 35 et 600 bases. **B)** Représentation de la boucle de télomère (t-loop) et la boucle de déplacement (d-loop).

graduellement à chaque division cellulaire en l'absence de mécanismes d'allongement (de Lange, Shiue *et al.* 1990; Harley, Futcher et Greider 1990; Hastie, Dempster *et al.* 1990; Lansdorp, Verwoerd *et al.* 1996; Moyzis, Buckingham *et al.* 1988). La longueur moyenne du brin 3' protubérant corrèle avec la longueur des télomères dans les cellules normales, transformées, ou dérivées de tumeurs d'humain, et sa longueur moyenne diminue en fonction de l'augmentation de l'âge réplcatif cellulaire (Keys, Serra *et al.* 2004; Lee, Rha *et al.* 2008; Stewart, Ben-Porath *et al.* 2003).

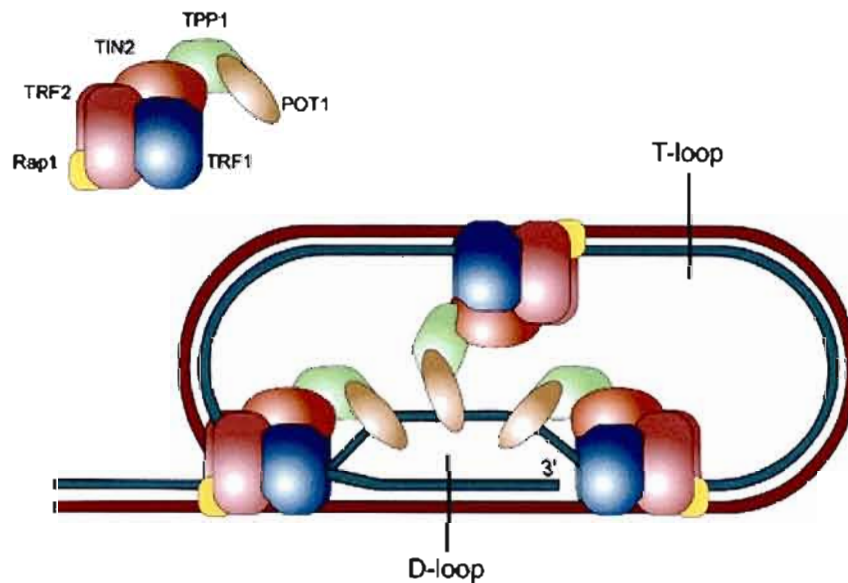
### 1.2.2 Télomère et capuchon télomérique

Afin d'empêcher la cellule de reconnaître l'ADN télomérique comme de l'ADN endommagé, la formation de la boucle de télomère est régulée par une pléthore de protéines qui sont reliées ou non aux histones. Les protéines non reliées aux histones sont divisées en deux catégories, soit les protéines du complexe «shelterin» et les protéines du télosome. Les protéines du complexe «shelterin» sont spécifiques aux télomères alors que les protéines du télosomes possèdent en plus du maintien des télomères, d'autres fonctions cellulaires. Chez les mammifères, le complexe «shelterin» est formé de six protéines dont fait partie TIN2 mentionnée auparavant, ainsi que TRF1, TRF2, RAP1, POT1 et TPP1. TRF1 et TRF2 «Telomeric Repeat binding Factors 1 and 2» lient les séquences répétées TAAGGG doubles brins sous forme d'homodimères, POT1 «Protection Of Telomere 1» lie la séquence répétée TTAGGG simple brin, alors que les 3 autres protéines RAP1 «Repressor Activator Protein 1», TIN2 «TRF1-Interacting Nuclear factor 2» et TPP1 «TriPeptidyl Peptidase 1» médient des interactions protéiques. RAP1 interagit avec TRF2, TPP1 avec POT1, et TIN2 interagit directement avec TRF1 et TRF2, et indirectement avec POT1 via son interaction avec TPP1 (Figure 1.3). Bien que peu de choses soient connues sur la régulation de la formation du capuchon télomérique, le complexe «shelterin» est essentiel à sa bonne formation et la perturbation de l'un ou l'autre de ses composants résulte en l'altération de la longueur des télomères (Palm et de Lange 2008; Verdun et Karlseder 2007; Xin, Liu et Songyang 2008).



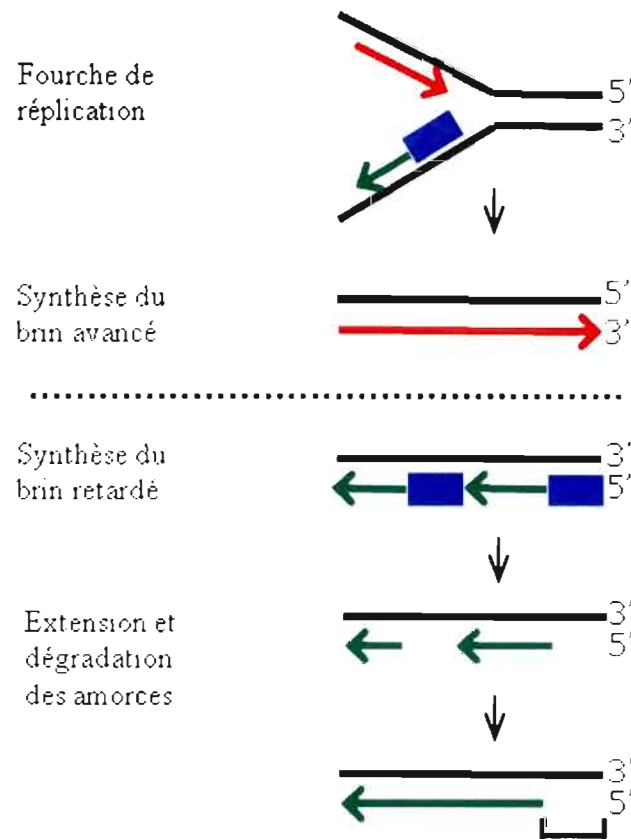
### 1.2.3 Érosion des télomères et sénescence

La réplication des extrémités chromosomiques est problématique pour la cellule. Lors de chaque division cellulaire, entre 100 à 200 bases de répétition TTAGGG télomériques sont perdues (Counter, Avilion *et al.* 1992; Harley, Futcher et Greider 1990; Shay et Wright 2000). Étant donné que la synthèse du brin retardé est initiée à partir d'amorces d'ARN (fragments d'Okazaki) qui sont par la suite dégradées, ce processus laisse un espace qui ne peut être répliqué à l'extrémité 3' du brin retardé (Figure 1.4). Ce phénomène créerait donc une



**Figure 1.3:** Représentation schématique de l'ADN télomérique associé aux six protéines du complexe «shelterin». Les protéines TRF1 (en bleu), TRF2 (en rouge) et Rap1 (jaune) sont associées à l'ADN télomérique double brin alors que TIN2 (en orange) est associée à TRF1 et TRF2. La protéine POT1 (en couleur doré) lie l'ADN simple brin et TPP1 (en vert) médie des interactions entre TIN2 et POT1 (tiré de Oeseburg, de Boer *et al.* 2009).

# Problème de réplication des extrémités chromosomiques

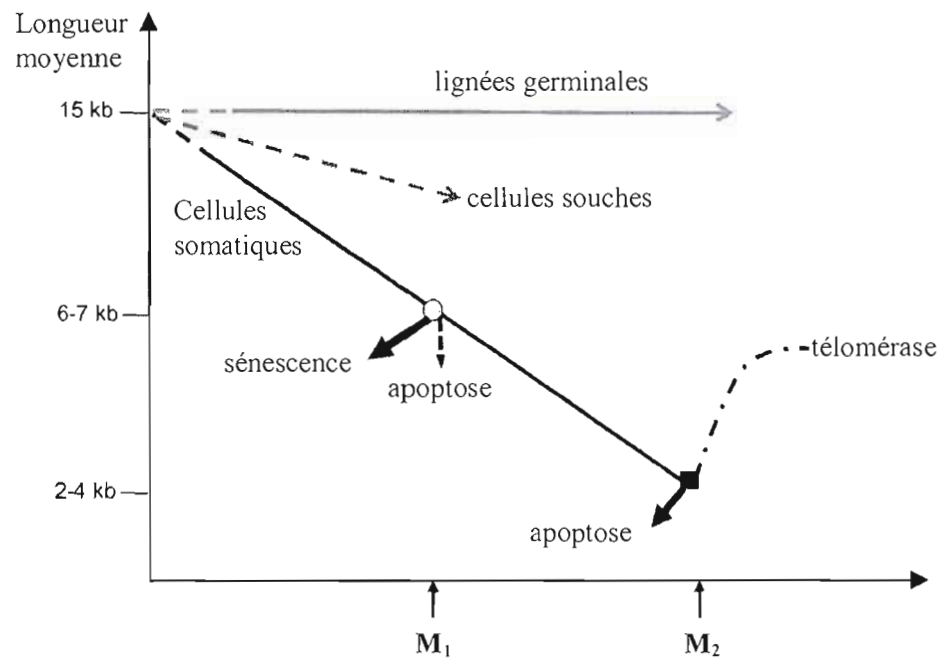


**Figure 1.4:** Problème de réplication et érosion des télomères. La synthèse du brin avancé est effectuée en une seule étape et produit un brin descendant (rouge) dont l'extrémité 3' correspond à l'extrémité 5' du brin parental. La synthèse du brin retardé (vert) est initiée par des amorces d'ARN (bleu) qui sont par la suite dégradées laissant un espace non répliqué à l'extrémité 5' du brin retardé (crochet noir).

érosion des télomères dépendante de la réplication chromosomique (Olovnikov 1973). Après chaque réplication, les bases terminales du brin riche en C sont également excisées selon un mécanisme inconnu pour former l'extrémité 3' protubérante nécessaire à la formation du capuchon télomérique, et ce phénomène contribuerait à l'érosion des télomères (Verdun et Karlseder 2007).

En 1961, Hayflick et Moorhead ont montré que des cellules somatiques en culture cessaient de se diviser après un certain nombre de division (Hayflick et Moorhead 1961). La limite de Hayflick est également connue comme le point de contrôle de mortalité 1 ( $M_1$ ) et à ce point les cellules cessent de se diviser, affichent des profils d'expressions différents et entrent dans un état de sénescence (Figure 1.5). Le phénotype de sénescence peut être engendré de plusieurs façons, entre autres par le dysfonctionnement des télomères, des dommages à l'ADN, le stress oxydatif et l'activation d'oncogènes. Dans tous les cas, l'activation de suppresseur de tumeur p53 et/ou pRb ainsi que des inhibiteurs de kinases dépendantes de cyclines p21 ou p16 cause un arrêt du cycle cellulaire (Collado, Blasco et Serrano 2007; von Zglinicki, Saretzki *et al.* 2005).

La sénescence induite par les télomères survient lorsqu'un ou des télomères sont érodés à un point où le capuchon télomérique n'arrive plus à se former. Ces télomères dysfonctionnels engendrent par la suite le recrutement de protéines impliquées dans la réparation de dommage à l'ADN, ainsi que la phosphorylation d'histone H2AX, de ATM («ataxia telangiectasia mutated») ou ATR («ATM-related») selon le cas, ce qui conduit à la phosphorylation de p53 et l'expression de p21. Après l'entrée en sénescence, les dommages à l'ADN télomérique persistent suggérant que les cellules sénescents sont dans un mode de réponse au dommage à l'ADN continu (Baird, Rowson *et al.* 2003; d'Adda di Fagagna, Reaper *et al.* 2003; Herbig, Jobling *et al.* 2004; Takai, Smogorzewska et de Lange 2003; von Zglinicki, Saretzki *et al.* 2005). De récentes études démontrent que TRF2 et POT1 répriment l'activation de ATM qui est activée par des brisures de l'ADN double brin, et de ATR qui est activée par des brisures de l'ADN simple brin, respectivement. Ceci démontre l'importance du complexe «shelterin» dans la protection des télomères (Denchi et de Lange 2007; Guo, Deng *et al.* 2007). La souris possède deux orthologues de POT1 (POT1a et POT1b). POT1a



**Figure 1.5:** Schéma de l'hypothèse de la sénescence cellulaire. L'axe y représente la longueur moyenne des télomères de cellules germinales, de cellules souches et de cellules somatiques en fonction de l'âge réplcatif cellulaire (axe des x). Les points correspondants aux crises de mortalité 1 et 2 des cellules somatiques sont également indiqués. La réactivation de la télomérase dans certaines cellules peut stabiliser le génome et permettre à ces dernières d'échapper à la sénescence et l'apoptose (adapté de Royle, Mendez-Bermudez *et al.* 2009).

réprime le dommage à l'ADN et POT1b régule négativement la longueur de l'ADN télomérique simple brin. Alors que des souris déficientes en POT1a meurent au stade embryonnaire, la perte de POT1b provoque l'allongement des extrémités télomériques protubérantes via une dégradation excessive du brin riche en C. Alors que la première génération de souris déficientes en POT1b est viable et fertile, les souris en G2 affichent certains symptômes similaires à ceux rencontrés dans la DC en plus d'être infertiles (réduction de la masse corporelle et des testicules, apoptose de cellules intestinales, hyperpigmentation de la peau, dystrophie des ongles et mort prématurée à 24 mois de vie). Ces symptômes s'aggravent lorsqu'elles sont croisées avec des souris déficientes pour l'ARN de la télomérase (réduction marquée de la masse corporelle, augmentation marquée de l'apoptose de cellules intestinales et de l'atrophie testiculaire, mort prématurée à la troisième semaine de vie). Plusieurs autres symptômes associés à la DC furent observés dans des souris  $Pot1b^{-/-}$   $mTR^{+/+}$ , dont l'aplasie de la moelle osseuse, une pancytopénie avec des leucopénies et des thrombopénies sévères accompagnées d'anémies légères, une apparition plus rapide de l'hyperpigmentation de la peau ainsi qu'une mort prématurée à environ 135 jours de vie. Cependant, aucune de ces souris n'affiche des leucoplasies orales ou une prédisposition au cancer, peut-être à cause du caractère tardif de ces symptômes (Autexier 2008). Il fut récemment démontré que les phénotypes observés chez les souris  $Pot1b^{-/-}$   $mTR^{+/+}$  sont causés une instabilité génomique provoquée par l'allongement du brin télomérique riche en G par rapport au brin riche en C, ce qui provoque la fusion des extrémités chromosomiques et active la voie de réponse au dommage de l'ADN dépendante de ATR (Hua Yang *et al.* 2009).

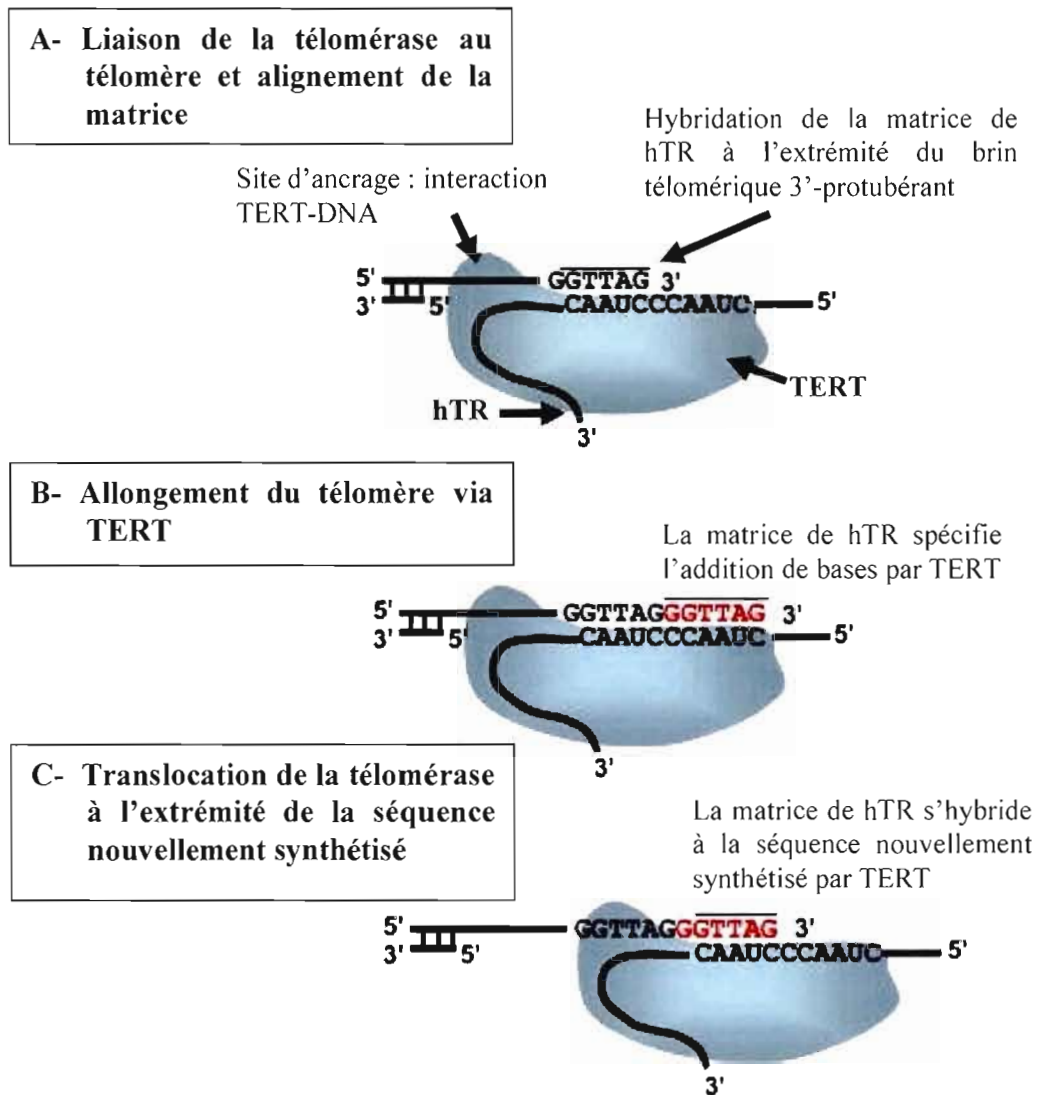
Il est possible que des cellules contournent l'arrêt de croissance induite via p53 lors de la crise de mortalité 1, par des événements génétiques qui provoquent la perte de fonction de p53 par exemple. En absence de mécanisme d'allongement des télomères, ces derniers rétrécissent graduellement. Lorsque qu'ils atteignent une longueur critique, les capuchons télomériques ne peuvent plus se former correctement et les chromosomes fusionnent entre eux, ce qui crée une instabilité génomique. En l'absence de mécanisme d'allongement des télomères, la majorité des cellules entrent en apoptose, un stade autrement connu comme la crise de mortalité 2 ( $M_2$  dans la Figure 1.5) (Capper, Britt-Compton *et al.* 2007).

#### 1.2.4 Allongement des télomères par la télomérase.

L'expression de l'enzyme télomérase permet de contrer ou de freiner l'érosion des télomères (Gilson et Geli 2007). Bien que la télomérase soit une ribonucléoprotéine complexe, son activité requiert la présence de la transcriptase inverse TERT et d'une composante ARN qui héberge la matrice de l'ADN télomérique utilisée par TERT lors de l'allongement du brin riche en G des télomères (Figure 1.6) (Collins 2008). Les cellules somatiques sont en général dépourvues de l'activité télomérase et tel que mentionné précédemment, cela provoque l'érosion des télomères et la sénescence cellulaire. Par contre, l'activité de la télomérase dans les lignées germinales permet à ces cellules de conserver la totalité de la longueur des télomères indépendamment de l'âge réplcatif cellulaire. L'activité télomérase est également présente dans des cellules progénitrices, mais cette activité serait insuffisante pour maintenir la pleine longueur des télomères au courant de la durée de vie humaine, contribuant au vieillissement des organes et tissus (Finkel, Serrano et Blasco 2007). La réactivation de la télomérase dans des cellules somatiques en culture permet d'éviter la sénescence et d'atteindre l'immortalité (Bodnar, Ouellette *et al.* 1998). L'accumulation de mutations provoquant l'activation d'oncogènes ou l'inactivation de répresseurs de tumeurs conduit cependant à la formation de tumeurs. Il y a des évidences que l'instabilité génomique créée par des télomères dysfonctionnels contribue à la formation tumorale, mais que pour survivre, un mécanisme d'allongement des télomères est nécessaire pour stabiliser le génome (Chin, de Solorzano *et al.* 2004). Il est intéressant de noter que la télomérase est active dans plus de 85 % des tumeurs (Greider et Blackburn 1996; Shay et Bacchetti 1997).

#### 1.3 snoRNA

Le nucléole est le compartiment sub-nucléaire le plus proéminent. C'est le site de transcription, de maturation et d'assemblage du rRNA en sous-unités ribosomiques (Lam, Trinkle-Mulcahy et Lamond 2005). Les petits ARN nucléolaires (snoRNA) ont une taille qui varie de 60 à 600 nucléotides (nt), mais la plupart ont une taille qui varie de 70 nt à 200 nt. Ils servent en majorité de guides dans les modifications post-transcriptionnelles de méthylation en 2'-OH du ribose (2'-O-méthylation) et de pseudouridylation de résidus du



**Figure 1.6:** Schéma de l'allongement des télomères par la télomérase. **A)** La télomérase se lie d'abord à l'ADN télomérique via TERT ce qui favorise l'appariement de la matrice de hTR à l'ADN télomérique. **B)** Le brin 3' protubérant est ensuite allongé par rétrotranscription de la matrice dans hTR par TERT. **C)** La télomérase est ensuite transloquée à l'extrémité de la séquence nouvellement synthétisé et le cycle est répété.



pré-rRNA (entre 100 et 200 résidus) chez les eucaryotes. Quelques snoRNA ne guident pas de réactions de modification, mais sont plutôt impliqués dans les réactions de clivage du pré-rRNA lors de sa maturation. Plusieurs snoRNA n'ont pas de cible(s) connue(s) et sont alors classés orphelins. Le rRNA et les tRNA d'archéobactéries sont également pseudouridylés et 2'-O-méthylés. Ces modifications sont guidées par des orthologues des snoRNA nommés sRNA, les archéobactéries étant dépourvues de noyau. Les s(no)RNA fonctionnent de concert avec des protéines pour former des s(no)RNP (Bachellerie, Cavaillé et Hüttenhofer 2002). La conservation de motifs, de protéines associées et l'assemblage de sRNP dans un système eucaryote évoquent un ancêtre commun aux snoRNA et sRNA datant d'environ 2 milliards d'années (Baker, Youssef *et al.* 2005; Massenet, Ansmant *et al.* 1999; Omer, Lowe *et al.* 2000; Speckmann, Li *et al.* 2002; Tran, Zhang et Maxwell 2003).

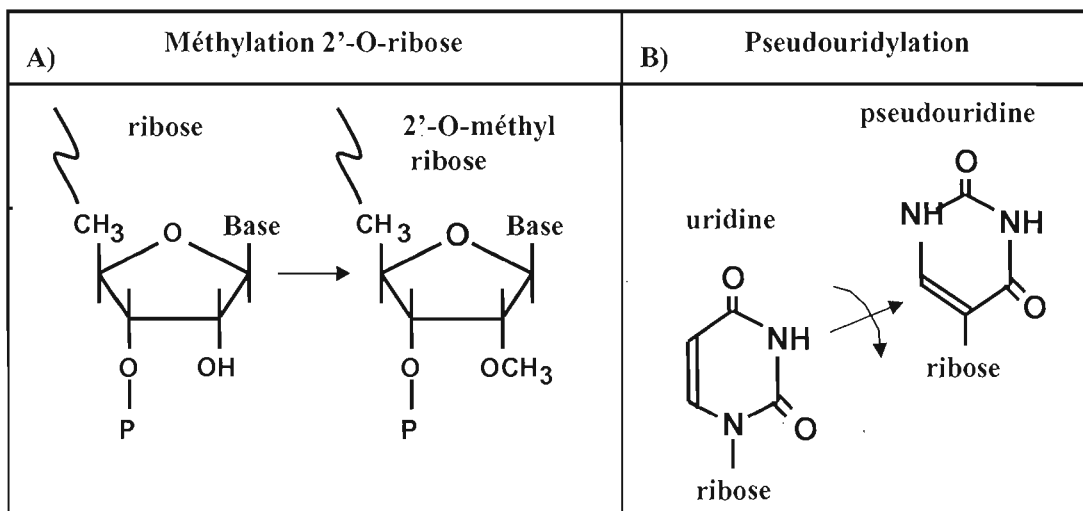
### 1.3.1 Structure et fonction des snoRNA

Basé sur la conservation de motifs, mis à part l'ARN 7-2/MRP de la RNase MRP, les snoRNA forment 2 familles; les snoRNA à boîtes C et D, et les snoRNA à boîtes H et ACA, qui guident principalement la 2'-O-méthylation et la pseudouridylation, respectivement (Bachellerie, Cavaillé et Hüttenhofer 2002) (Figure 1.7).

#### 1.3.1.1 snoRNA à boîtes C et D

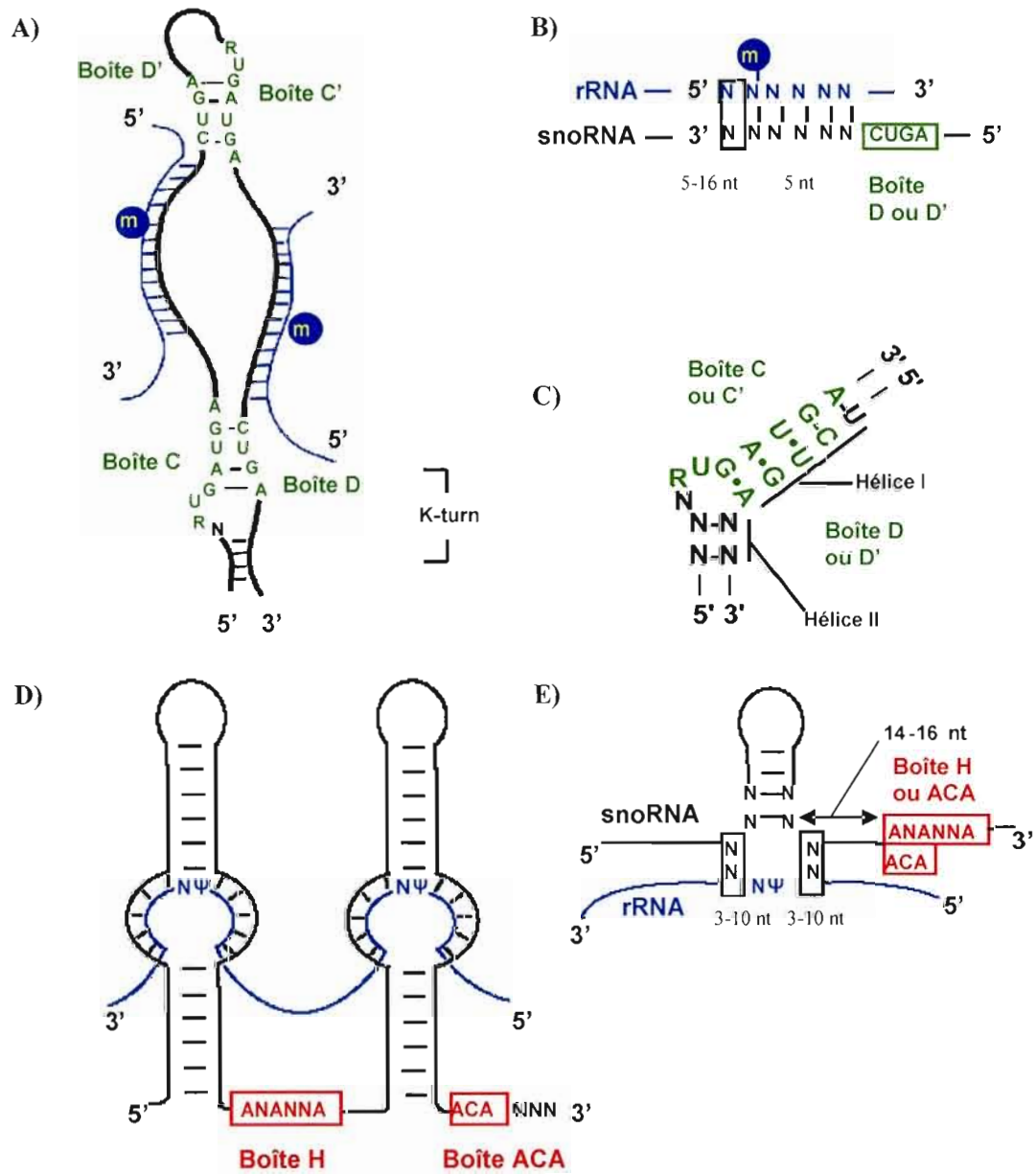
Les membres de cette famille sont caractérisés par deux motifs conservés; soit une boîte C (PuUGAUGA) et une boîte D (CUGA) localisées aux extrémités 5' et 3', respectivement (Figure 1.8A). La plupart des snoRNA à boîtes C et D contiennent également des boîtes dégénérées C' et D' (Kiss-Laszlo, Henry et Kiss 1998), et la majorité d'entre eux comporte une ou deux séquences antisens de 10-21 nt qui sont complémentaires au rRNA/snRNA cible destiné à être méthylé. Ces séquences antisens sont positionnées juste en amont de la boîte D et/ou D', et le nucléotide à être méthylé est toujours apparié au 5<sup>ème</sup> nucléotide en amont des boîtes D ou D' (Figure 1.8B) (Kiss-Laszlo, Henry *et al.* 1996; Nicoloso, Qu *et al.* 1996).





**Figure 1.7:** Modifications post-transcriptionnelles effectuées par les snoRNP. **A)** 2'-O-méthylation guidée par les snoRNP C/D. **B)** Réaction d'isomérisation d'une uridine en pseudouridine guidée par les snoRNP H/ACA.

Les boîtes C et D ainsi que C' et D' peuvent s'apparier pour former un motif hélice - boucle asymétrique - hélice nommé «Kink-turn» («K-turn») dont les deux hélices forment un angle d'environ  $120^\circ$  (Figure 1.8C). La première hélice est formée de deux paires Watson-Crick, la boucle asymétrique compte trois nucléotides, et l'hélice deux comporte deux paires G•A suivies d'une paire U•U. Cette structure fut à l'origine découverte dans un cristal du snRNA U4 (Nottrott, Hartmuth *et al.* 1999; Vidovic, Nottrott *et al.* 2000), et ensuite dans le rRNA bactérien et archéobactérien (Schluenzen, Tocilj *et al.* 2000). Chez les eucaryotes, les boîtes C' et D' sont souvent plus dégénérées que chez les archéobactéries et ne forment habituellement pas un motif K-turn typique (Henras, Dez et Henry 2004; Watkins, Segault *et al.* 2000).



**Figure 1.8:** Structure et mode d'action des snoRNA guides. **A)** Motif consensus des snoRNA guides à boîtes C et D (vert). **B)** L'ARN cible (bleu) est apparié sur une distance de 10-21 nucléotides en amont de la boîte D ou D' et le ribose du 5<sup>ème</sup> résidu en amont de la boîte D/D' est méthylé (m). **C)** K-turn consensus des snoRNA à boîtes C/D. **D)** Motif

consensus des snoRNA à boîtes H et ACA (rouge). L'ARN cible (bleu) est apparié sur une distance de trois à dix nucléotides de part et d'autre de l'hélice adjacente à la boucle de pseudouridylation. **E)** L'uridine cible ( $\Psi$ ) est située 14-16 nt en aval ou en amont des boîtes H ou ACA (adapté de Dragon, Lemay et Trahan 2006; Henras, Dez et Henry 2004).

### 1.3.1.2 snoRNA à boîtes H et ACA

Les snoRNA de la famille H/ACA sont quant à eux caractérisés par un domaine tige boucle - boîte H – tige boucle – boîte ACA (Figure 1.8D). Les boîtes H et ACA représentent respectivement les séquences consensus simple brin ANANNA et le triplet ACA, lequel est situé exactement trois nucléotides en amont de l'extrémité 3' terminale (Balakin, Smith et Fournier 1996; Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss 1997). Chacune des tige-boucles (5' et 3') contient une boucle interne qui peut comporter deux séquences de trois à dix nucléotides complémentaires à la séquence flanquant l'uridine cible du rRNA. Ces séquences sont situées de part et d'autre de la base de l'hélice adjacente (boucle de pseudouridylation) embrassant deux nt dont l'uridine cible. L'uridine cible (Figure 1.8E) est localisée à une distance de 14-16 nucléotides de la boîte H ou ACA. Les boîtes H et ACA, de même que les hélices adjacentes aux boucles internes de pseudouridylation, sont essentielles à l'accumulation des snoRNA de cette famille *in vivo* (Balakin, Smith et Fournier 1996; Bortolin, Ganot et Kiss 1999; Ganot, Bortolin et Kiss 1997; Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss 1997; Hüttenhofer, Kieffmann *et al.* 2001; Jady et Kiss 2001; Narayanan, Lukowiak *et al.* 1999; Ni, Tien et Fournier 1997). Chez les archéobactéries, les sRNA à boîtes H et ACA sont formés d'une ou trois tige-boucles dépourvues de boîte H. Les sRNA à boîtes H et ACA comportant trois tige-boucles hébergent deux boîtes ACA ou une boîte ACA et une boîte dégénérée AGA. Ils renferment également un motif K-turn qui est absent des snoRNA à boîtes H/ACA eucaryotes (Dennis et Omer 2005; Henras, Dez et Henry 2004; Rozhdestvensky, Tang *et al.* 2003).

### 1.3.1.3 snoRNA non guides

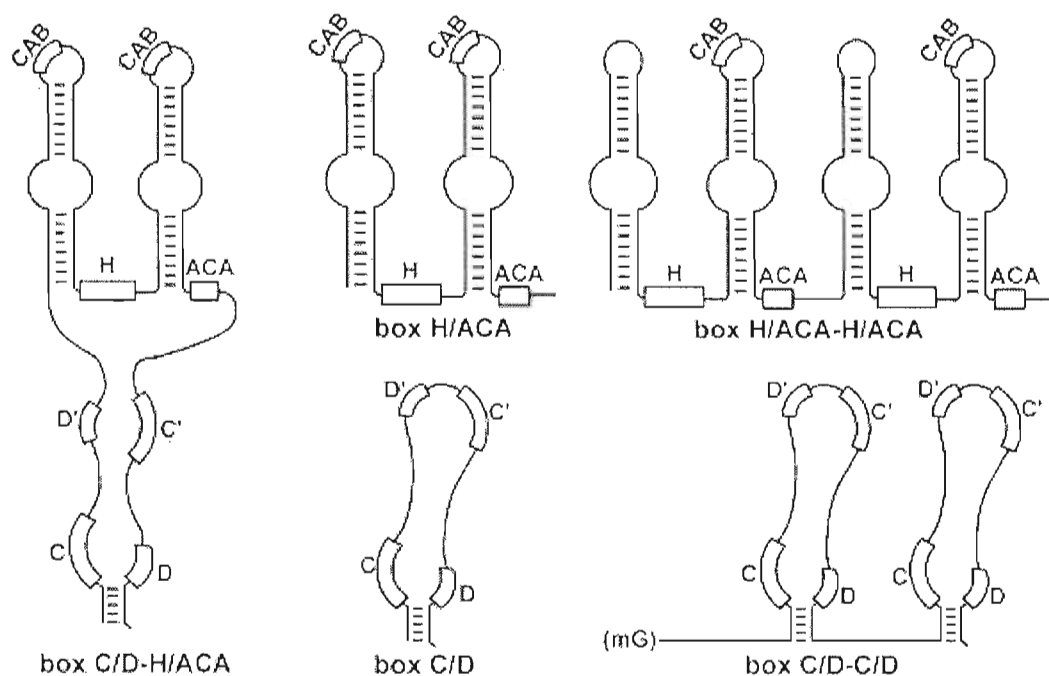
Quelques snoRNA à boîtes C/D et H/ACA ne servent pas de guide pour la méthylation ou la pseudouridylation, mais sont plutôt impliqués dans les réactions de clivage du pré-

rRNA lors de sa maturation. Chez la levure, les snoRNA U3, U14, snR10 et snR30 sont impliqués dans les premières réactions de clivage du pré-rRNA conduisant au rRNA 18S mature (Hughes et Ares 1991; Li, Zagorski et Fournier 1990; Morrissey et Tollervey 1993) alors que la RNase MRP clive le pré-rRNA au site A<sub>3</sub> et permet la production de 5.8S mature (Lindahl, Archer et Zengel 1992; Schmitt et Clayton 1993; Shuai et Warner 1991). Le RNA 7-2/MRP n'appartient pas aux familles de snoRNA à boîtes C/D ou H/ACA, mais serait plutôt apparenté à l'ARN de la RNase P, qui clive les extrémités 5' des pré-tRNA (Darzacq, Jady *et al.* 2002; Walker et Engelke 2006). Chez les vertébrés, ce sont les snoRNA U3, U14, U22 et E1/U17 (snR30) qui participent aux clivages précoces du rRNA liés à la production de rRNA 18S mature (Atzorn, Fragapane et Kiss 2004; Cavaillé, Hadjiolov et Bachellerie 1996; Enright, Maxwell *et al.* 1996; Kass, Tyc *et al.* 1990; Tyc et Steitz 1989). Le snoRNA U8 est quant à lui, essentiel à la maturation du rRNA 28S et 5.8S (Peculis 1997; Peculis et Steitz 1993).

#### 1.4 scaRNA et ARN de la télomérase.

Les corps de Cajal sont des compartiments sub-nucléaires mobiles retrouvés chez les plantes et les animaux et ils sont étroitement liés aux nucléoles (Cioce et Lamond 2005). Ils renferment une série de petits ARN (scaRNA) structurellement et fonctionnellement similaires aux snoRNA à boîtes H/ACA et/ou C/D qui guident des réactions de 2'-O-méthylation et la pseudouridylation de snRNA des spliceosomes majeur et mineur (Figure 1.9). Certains d'entre eux comportent un seul domaine H/ACA ou C/D comme U90, U91 ou U92. D'autres possèdent un motif H/ACA en plus d'un motif C/D tel que U85, U87, U88 et U89 (Darzacq, Jady *et al.* 2002). Enfin, U93 est composé de 2 domaines H/ACA (Kiss, Jady *et al.* 2002). Les scaRNA contenant un domaine H/ACA comportent une séquence consensus ugAG dans une ou dans les deux boucles terminales de chacune des tige-boucles. Les deux premiers nucléotides de la séquence sont variables alors que les deux derniers sont très conservés (Richard, Darzacq *et al.* 2003). Cette séquence consensus est également présente dans le domaine ressemblant au domaine H/ACA de hTR (Jady, Bertrand et Kiss 2004) (Figure 1.10), et est localisée dans la boucle terminale de la tige-boucle 3'. Ce domaine est situé en 3' du pseudonœud contenant la séquence matrice télomérique et est essentiel à la

stabilité et l'accumulation de hTR *in vivo* (Mitchell, Cheng et Collins 1999). Bien que le domaine H/ACA au complet soit essentiel à l'accumulation de hTR *in vivo*, la tige boucle 3' et la boîte



**Figure 1.9:** Schéma de la structure des scaRNA d'humain. Les positions des boîtes H/ACA et C/D sont indiquées. Les scaRNA H/ACA contiennent des boîtes CAB localisées dans les boucles terminales de la tige-boucle 5' ou 3', ou même dans les deux tiges-boucles (Tiré de Kiss, Fayet *et al.* 2006)

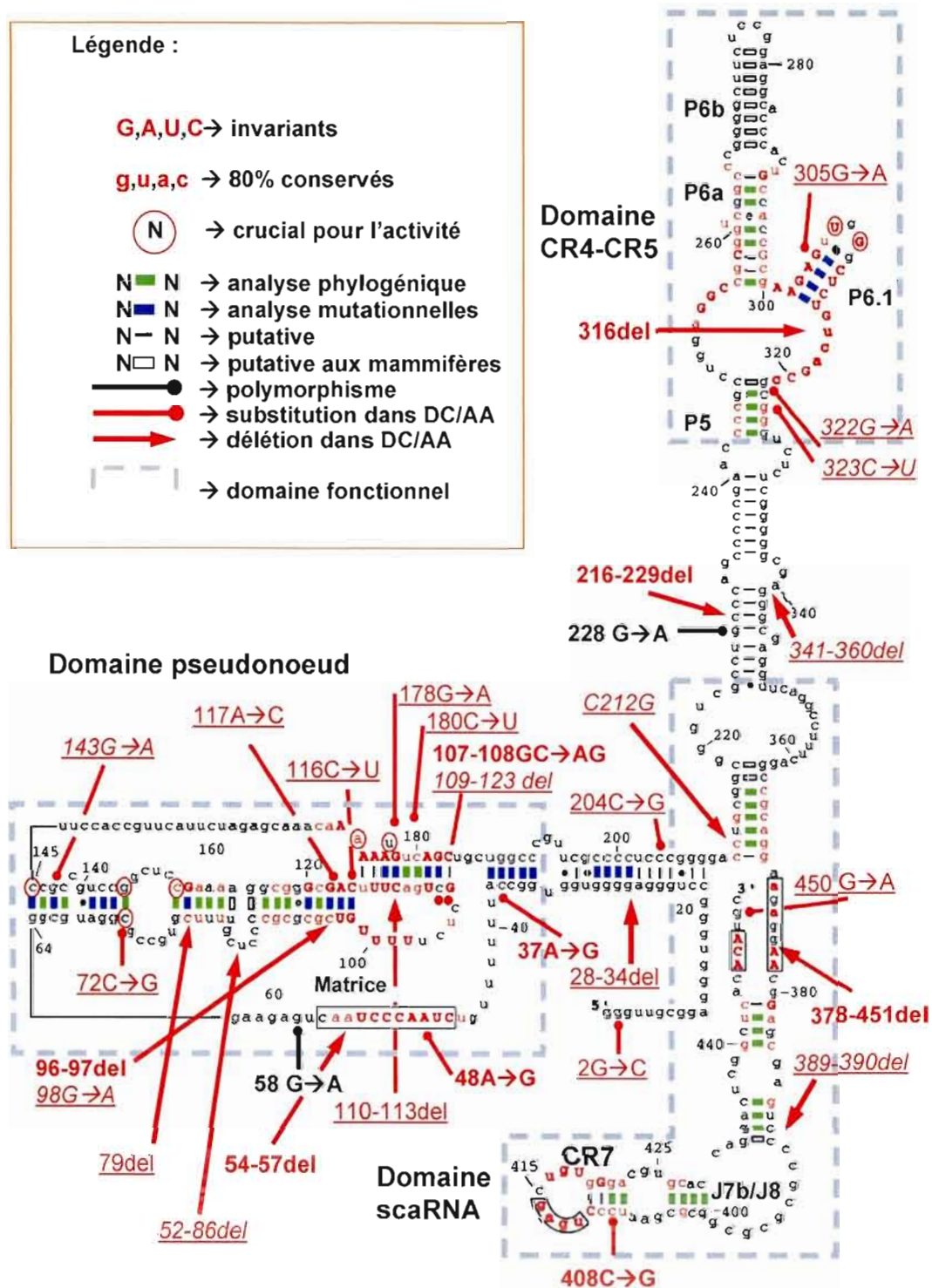
ACA (sans boîte H) sont suffisantes pour former une RNP *in vitro* (Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000). La boucle interne J7b/J8 et le domaine conservé 7 (CR7) de hTR sont essentiels à sa dimérisation *in vitro* (Ren, Gavory *et al.* 2003; Wenz, Enenkel *et al.* 2001), mais ces études n'incluent pas toutes les composantes protéiques de la RNP. Des mutations dans hTR associées à la DC et d'autres désordres sont également présentes le domaine H/ACA de hTR (Figure 1.10) (Marrone, Walne et Dokal 2005; Ortmann, Niemeyer *et al.* 2006; Vulliamy, Marrone *et al.* 2002).

### 1.5 Protéines communes aux s(no)RNP C/D

Chez les eucaryotes, quatre protéines sont communément associées aux snoRNP C/D, soit : fibrillarine (*H. sapiens*)/Nop1p (*S. cerevisiae*), NOP56, NOP58 et 15.5K (*H. sapiens*)/Snul3p (*S. cerevisiae*) (Gautier, Berges *et al.* 1997; Schimmang, Tollervey *et al.* 1989; Watkins, Segault *et al.* 2000). Chez les *Archaea*, trois orthologues sont communs aux sRNP; fibrillarine, Nop5 (NOP56/58), et L7Ae (Snul3/15.5K) (Figure 1.11) (Kuhn, Tran et Maxwell 2002; Omer, Ziesche *et al.* 2002)

#### 1.5.1 Snul3p/15.5K/L7Ae

Ces trois orthologues interagissent spécifiquement avec les motifs K-turn (Klein, Schmeing *et al.* 2001). L7Ae est l'homologue archéobactérien se rapprochant le plus de 15.5K et Snul3p. Entre l'humain et les *Archaea*, environ 41% de la séquence en acides aminés est conservée (Kuhn, Tran et Maxwell 2002). L7Ae fait partie de trois types de RNP; la grande sous-unité ribosomique, les sRNP C/D et H/ACA. La protéine 15.5K fut également retrouvée associée au K-turn du snRNA U4 (Vidovic, Nottrott *et al.* 2000). Il est probable qu'un gène ancestral ait divergé pour produire les paralogues eucaryotiques Nhp2, 15.5K/Snul3p et des protéines ribosomiques L7a, L30 et S12, qui sont assemblées dans les RNP correspondantes (snoRNA à boîtes H/ACA, snoRNA à boîtes C/D et les sous-unités ribosomiques) (Klein, Schmeing *et al.* 2001).



**Figure 1.10:** Modèle de la structure secondaire de hTR. Les trois domaines conservés, le pseudonoeud/matrice, les régions conservées 4 et 5 (CR4-CR5) et le domaine scaRNA à

boîtes H et ACA sont délimités par des boîtes hachurées. La région conservée 7 (CR7) contient le motif consensus ugAG des scaRNA. Les résidus invariables des vertébrés sont représentés en lettres majuscules rouges et les résidus conservés à plus de 80% en lettres minuscules rouges. Les appariements des bases supportés par l'analyse de co-variation phylogénétique et par analyses mutationnelles sont représentés en vert et bleu, respectivement. Les motifs conservés (matrice du pseudonoed, boîtes H et ACA et CAB) sont encadrés en noir. Les polymorphismes sont indiqués en noir et les mutations associées à des pathologies en rouge. Les mutations associées à la DC sont en gras, les mutations associées à l'anémie aplasique sont soulignées. Les mutations associées au syndrome de myélodysplasie, à la thrombocytose essentielle, à des désordres hépatiques ou à la fibrose pulmonaire idiopathique sont soulignées et en italique (Adapté de Calado, Regal *et al.* 2009; Chen et Greider 2004; Kirwan, Vulliamy *et al.* 2009; Vulliamy et Dokal 2008).

### 1.5.2 NOP56/NOP58/Nop5

NOP56 et NOP58 sont apparentées et affichent 44% d'homologie en acides aminés chez l'humain et 43% chez la souris. Les archéobactéries ne possèdent qu'un homologue de NOP56 et NOP58 (Nop5), ce qui suggère une divergence génique issue d'un ancêtre commun (Gautier, Berges *et al.* 1997; Newman, Kuhn *et al.* 2000).

### 1.5.3 Fibrillarine

Les patients souffrant de sclérodémie possèdent des auto-anticorps dirigés contre la fibrillarine et ces anticorps sont capables de reconnaître les homologues de la fibrillarine dans différents organismes. La découverte et l'utilisation de ces anticorps en recherche fut à l'origine de la découverte de la fibrillarine et du snoRNA U3 (Ochs, Lischwe *et al.* 1985; Pollard, Reimer et Tan 1989; Reimer, Steen *et al.* 1988). La fibrillarine eucaryote contient un domaine riche en glycine et arginine (GAR), qui est un domaine de liaison à l'ARN. Ce domaine est absent de la fibrillarine des *Archaea* (Amiri 1994; Aris et Blobel 1991). La structure cristalline de la fibrillarine d'*Archaea* révèle que son domaine C-terminal est très



similaire au domaine catalytique commun à plusieurs méthyltransférases S- adénosylméthionine-dépendante. L'analyse phylogénique des homologues de la fibrillarine suggère fortement que toutes contiennent un domaine méthyltransférase (Wang, Boisvert *et al.* 2000). De plus, certaines mutations ponctuelles dans le domaine méthyltransférase putatif de la fibrillarine de la levure inhibent radicalement la méthylation des riboses (Tollervey, Lehtonen *et al.* 1993). La fibrillarine serait donc la méthyltransférase catalysant la réaction de 2'-O-méthylation du ribose.

#### 1.5.4 s(no)RNP C/D

Le «K-turn» formé par l'appariement des boîtes C/D ou C'/D' des s(no)RNA forme une région charnière essentielle à la nucléation de l'assemblage de la RNP (Figure 1.8C et 1.11) (Bortolin, Bachellerie et Clouet-d'Orval 2003; Cahill, Friend *et al.* 2002; Omer, Ziesche *et al.* 2002; Rashid, Aittaleb *et al.* 2003; Szewczak, DeGregorio *et al.* 2002; Tran, Zhang et Maxwell 2003). L'altération de l'uridine, de la guanine ou de l'adénosine en 5' de la boîte C empêche l'interaction de 15.5K ou de L7Ae avec les s(no)RNA (Szewczak, DeGregorio *et al.* 2002; Watkins, Segault *et al.* 2000). La substitution des deux paires Watson-Crick dans l'hélice II par d'autres paires de nucléotides formant également des paires Watson-Crick n'empêche pas l'interaction de 15.5K ou L7Ae au s(no)RNA mais empêche l'interaction des autres protéines communes aux boîtes C/D (Kuhn, Tran et Maxwell 2002; Watkins, Dickmanns et Luhrmann 2002). L'uridine en 3' de la boîte C peut-être pontée à NOP58 et l'uridine de la boîte D à la fibrillarine par analyses de liaisons transversales "crosslink" (Cahill, Friend *et al.* 2002). Les boîtes C/D canoniques des s(no)RNA sont donc capables d'initier l'assemblage de 15.5K, NOP58 et fibrillarine. Les boîtes C' et D' des *Archaea* varient peu (Gaspin, Cavaillé *et al.* 2000; Omer, Lowe *et al.* 2000) comparé aux séquences consensus et elles sont capables d'initier l'assemblage de L7Ae, Nop5 et fibrillarine indépendamment des boîtes C et D (Bortolin, Bachellerie et Clouet-d'Orval 2003; Rashid, Aittaleb *et al.* 2003; Tran, Zhang et Maxwell 2003). Contrairement aux *Archaea*, chez les eucaryotes, les boîtes C' et D' des snoRNA sont en général plus dégénérées, et les paires G•A essentielles à la formation du K-turn et donc à la liaison de la 15.5K ne sont pas conservées (Kiss-Laszlo, Henry et Kiss 1998). Par conséquent, les boîtes C' et D' eucaryotiques sont

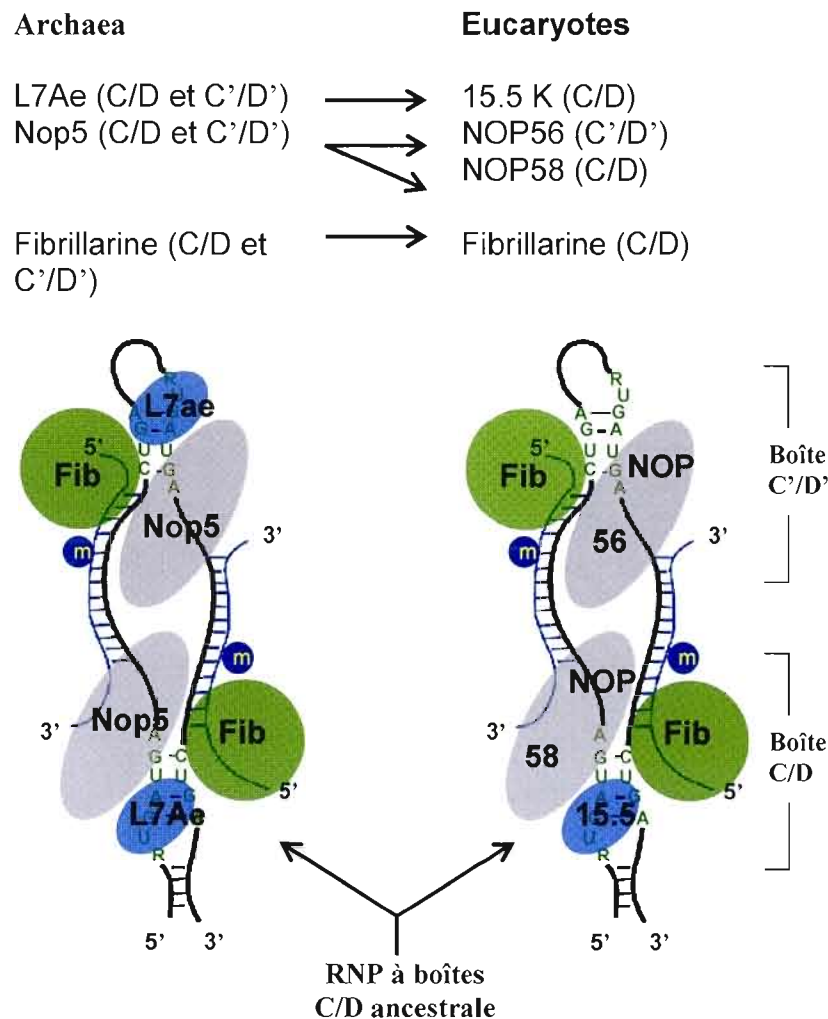
associées respectivement avec NOP56 et fibrillarine en absence de la 15.5K (Cahill, Friend *et al.* 2002).

## 1.6 Protéines communes aux snoRNP H/ACA

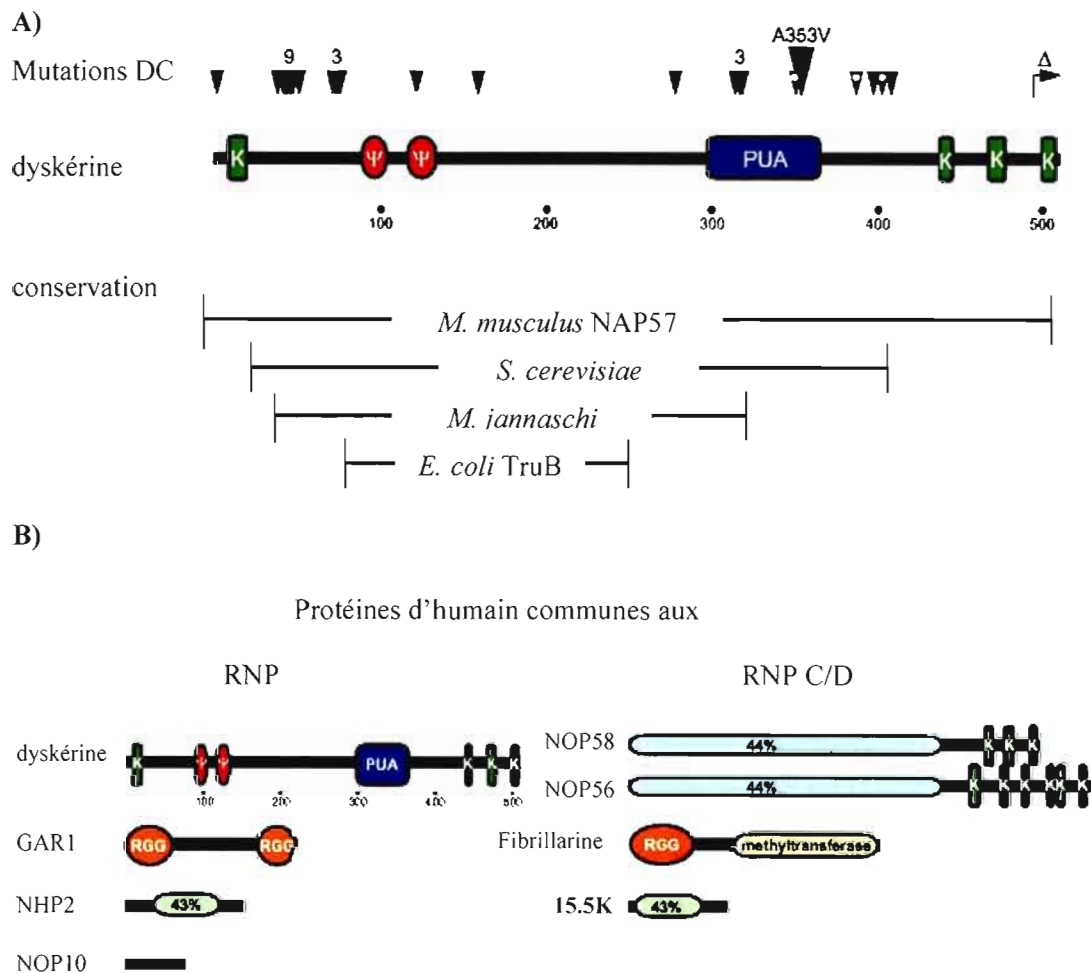
Comme pour les snoRNP C/D, les snoRNP H/ACA partagent également quatre protéines communes, soit NHP2, NOP10, GAR1 et la dyskérine (également nommée Cbf5 ou NAP57). Quant aux sRNP H/ACA, Elles partagent les orthologues eucaryotiques (aNop10, aCbf5, et aGar1) à l'exception de L7Ae qui remplace Nhp2.

### 1.6.1 Dyskérine (Cbf5, NAP57)

La dyskérine (Cbf5) fut à l'origine découverte dans la levure comme un facteur liant les centromères (Jiang, Middleton *et al.* 1993). Comme les autres protéines H/ACA, la dyskérine est très conservée dans l'évolution (Figure 1.12). Par homologie de séquence, les prédictions font de la dyskérine une pseudouridine synthase putative. Au centre de la portion N-terminale, la dyskérine renferme deux motifs conservés dans la plupart des pseudouridines synthases. Le centre de la région C-terminale quant à lui contient un domaine de liaison à l'ARN (PUA) qui est aussi conservé dans les pseudouridine synthases et les archéosine transglycosylases (Aravind et Koonin 1999; Gustafsson, Reid *et al.* 1996; Hoang et Ferre-D'Amare 2001; Koonin 1996; Watkins, Gottschalk *et al.* 1998). La dyskérine eucaryotique possède des extensions N et C-terminales qui sont absentes de son orthologue archéobactérien. Chez l'humain, le domaine C-terminal comporte trois séries de lysines répétées et le domaine N-terminal en contient également une. Ces groupes de lysines sont impliqués dans la localisation nucléolaire de la protéine (Heiss, Girod *et al.* 1999) et sont absents des archéobactéries (Youssofian, Gharibyan et Qatanani 1999).



**Figure 1.11:** Divergence des sRNP et snoRNP C/D. Divergence d'une RNP ancestrale ayant conduit à une symétrie des sRNP à boîtes C/D d'archéobactérie versus une asymétrie des snoRNP C/D eucaryotes. Le trimère fibrillarine, Nop5 et L7Ae peut assembler les boîtes C/D ainsi que les boîtes C'/D' des sRNA qui forment tous deux des structures de K-turn. Les boîtes C/D des snoRNA sont assemblées par les orthologues fibrillarine, NOP58 et la 15.5, alors que les boîtes C'/D' qui adoptent rarement une structure de K-turn sont assemblées par fibrillarine et NOP56 en l'absence de la 15.5 K (Adapté de Tran, Zhang et Maxwell 2003).



**Figure 1.12:** Schéma des domaines des protéines communes aux RNP H/ACA et C/D.

**A)** Domaines relatifs à la séquence de la dyskérine. Les résidus lysines répétés sont en vert, les deux motifs conservés dans la plupart des pseudouridines synthases en rouge, et le domaine de liaison à l'ARN conservé dans les pseudouridine synthases et les archeosine transglycosylases (PUA) en bleu. La majorité des mutations rencontrées dans la protéine de patients atteints de la forme liée à l'X de DC sont identifiées à l'aide de pointes de flèches, dont la mutation A353V qui est la plus fréquente. La délétion de l'extrémité C-terminale également retrouvée dans la pathologie est indiquée ( $\Delta$ ). La différence de taille entre les orthologues de la dyskérine, soit NAP57, Cbf5p et aCbf5 est indiquée sous la séquence en

plus de la région homologue de la pseudouridine synthase TruB de *E.coli*. **B)** Similarités entre les protéines H/ACA et C/D d'humain. NOP56, NOP58 et la dyskérine partagent des répétitions de résidus lysines (vert). La fibrillarine contient un domaine GAR (orange) alors que GAR1 exhibe un domaine GAR à chaque extrémité. NHP2 et la 15.5K partagent une région au cœur de ces protéines, et aucun homologue de NOP10 n'est retrouvé dans les RNP C/D (adapté de Meier 2005).

### 1.6.2 NHP2 (L7Ae).

NHP2 fut originalement identifiée comme une protéine de la chromatine (Kolodrubetz, Haggren et Burgum 1988). Son plus proche orthologue chez les *Archaea* est L7Ae et l'homologie se situe dans la région centrale de L7Ae (Nottrott, Hartmuth *et al.* 1999). Bien que L7Ae interagisse avec le motif K-turn des sRNA à boîtes C/D et H/ACA, NHP2 eucaryotique ne reconnaît aucun motif spécifique, mais s'associe de façon non spécifique aux structures secondaires des ARN (Henras, Dez *et al.* 2001; Wang et Meier 2004). Comme les snoRNA à boîtes H/ACA ne contiennent pas de motif K-turn, il est probable que NHP2 ait perdu sa spécificité d'interaction avec l'ARN pour la regagner en s'associant aux autres protéines communes aux RNP H/ACA eucaryotiques (Wang et Meier 2004).

### 1.6.3 NOP10

NOP10 est la plus petite protéine commune aux s(no)RNP (64 acides aminés chez l'humain). Des cristaux de aNop10 associée à aCbf5, ou en complexe avec aCbf5 et aGar1 ont été obtenus chez l'*Archaea*, en présence de aCbf5, de aCbf5 en plus de aGar1, ainsi que dans une sRNP complète. Les cristaux révèlent la présence d'un domaine de liaison au zinc (Auld 2001; Krishna, Majumdar et Grishin 2003) "zinc ribbon" formé de deux brins bêta compactés à l'extrémité N-terminale, et d'une hélice alpha en C-terminal de la protéine. Ces deux domaines sont reliés par une courte séquence non structurée (Hamma, Reichow *et al.* 2005; Li et Ye 2006; Rashid, Liang *et al.* 2006). Une structure de l'homologue Nop10p de *S. cerevisiae* a été obtenue par RMN, et celle-ci révèle la présence d'une seule épingle bêta à l'extrémité N-terminale et d'un domaine C-terminal non structuré (Khanna, Wu *et al.* 2006).

Par contre, lorsque Nop10p est mis en présence de aCbf5, la région non structurée de Nop10p adopte une structure similaire à celle adoptée par aNop10 lorsque liée à aCbf5 (Hamma, Reichow *et al.* 2005; Reichow et Varani 2008).

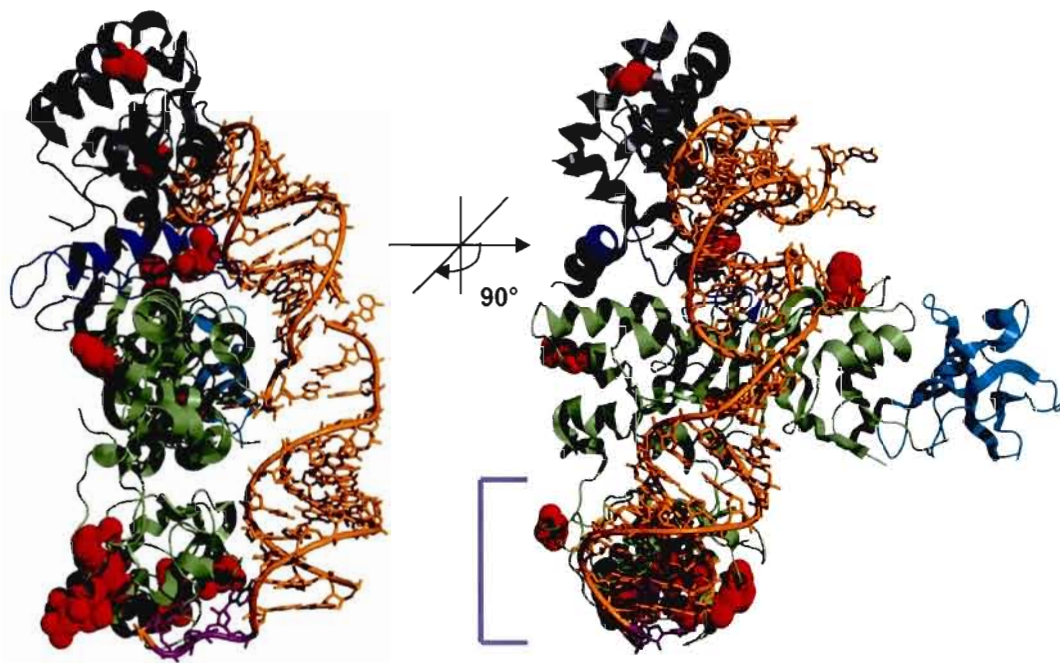
#### 1.6.4 GAR1

Chez les eucaryotes, GAR1 est constituée d'une séquence cœur conservée qui est flanquée de domaines GAR qui sont de longueur variables (Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000; Watkins, Gottschalk *et al.* 1998). Les domaines GAR flanquant la séquence cœur sont non essentiels à la localisation et la fonction de la protéine chez l'homme et la levure (Girard, Bagni *et al.* 1994; Girard, Caizergues-Ferrer et Lapeyre 1993; Girard, Lehtonen *et al.* 1992; Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000; Watkins, Gottschalk *et al.* 1998), et sont absents de l'orthologue archéobactérien aGAR1 (Watanabe et Gray 2000). La protéine aGAR1 présente une structure de baril formé de six brins bêta (Figure 1.13). Ce domaine appartient à la superfamille de facteurs d'isomérase/réductase/élongation. Dans plusieurs cas, ce domaine est impliqué dans la liaison à l'ARN, mais fut aussi associé à des interactions protéine-protéine (Rashid, Liang *et al.* 2006). Des tests de liaison entre l'orthologue de la levure Gar1p traduite *in vitro* et des snoRNA transcrit *in vitro* révèlent une interaction directe entre Gar1p et les snoRNA. Cette interaction est cependant très sensible au sel et est perdue presque totalité en présence de 100 mM de KCl (Bagni et Lapeyre 1998).

#### 1.6.5 s(no)RNP H/ACA

Des sRNP H/ACA fonctionnelles d'*Archaea* ont été assemblées *in vitro* (Baker, Youssef *et al.* 2005; Charpentier, Muller et Branlant 2005) contrairement aux sno/scaRNP eucaryotiques, chez qui des facteurs additionnels sont requis (voir section 1.10).

Les quatre protéines (dyskérine, NOP10, NHP2 et GAR1) peuvent former un complexe protéique en absence d'ARN. Les protéines de rat GAR1 et NOP10 interagissent directement avec la dyskérine de rat indépendamment l'une de l'autre, alors que l'interaction entre NHP2 et la dyskérine est médiée par NOP10 formant ainsi un trimère NHP2-NOP10- dyskérine.



**Figure 1.13:** Structure cristalline d'une sRNP d'archéobactérie. L'hétérologue de NHP2 (L7Ae) est en noir, de NOP10 (aNop10) en bleu, de dyskérine (aCbf5) en vert, de GAR1 (aGar1) en cyan, et le sRNA Afu46 est en orange. Le domaine de liaison à l'ARN de la dyskérine qui est sous-jacent au domaine catalytique est indiqué à l'aide d'un crochet gris dans l'image de droite, et la boîte ACA du sRNA qui y est lié est en mauve. Les mutations reliées à la DC dans NHP2, NOP10 et la dyskérine qui peuvent étre transposées sur la structure cristalline sont identifiées en rouge. Les extensions N- et C-terminales de la dyskérine ainsi que les mutations qui y sont associées sont absentes. L'image a été produite avec le logiciel PyMol à partir des coordonnées du cristal (2HVY.pdb) publié par Li et Ye en 2006.

Ce trimère est le complexe minimal capable de lier hTR et le snoRNA E3 (Wang et Meier 2004). Ces interactions protéiques sont majoritairement conservées chez la levure et les *Archaea* (Baker, Youssef *et al.* 2005; Charpentier, Muller et Branlant 2005; Henras, Capeyrou *et al.* 2004). D'après la structure cristalline d'une sRNP H/ACA (Figure 1.13), le domaine PUA sous-jacent au domaine catalytique de la dyskérine serait plutôt formé par le repliement des extrémités N- et C-terminales. L'ARN de la sRNP interagit avec l'interface du trimère aCbf5-aNop10-L7Ae. La boîte ACA du sRNA interagit avec le domaine de liaison à l'ARN de dyskérine (PUA) alors que la boucle interne de pseudouridylation est localisée à proximité du domaine catalytique. La portion supérieure de la tige-boucle est quant à elle associée à aNop10 et L7Ae.

## 1.7 scaRNP et télomérase

Les quatre protéines communes aux snoRNP H/ACA matures sont aussi retrouvées associées à hTR (Dez, Henras *et al.* 2001; Fu et Collins 2007; Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006; Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000), et sont toutes les quatre très probablement également associées aux scaRNA H/ACA (Darzacq, Jady *et al.* 2002; Kiss, Jady *et al.* 2004; Kiss, Jady *et al.* 2002). Tel que mentionné précédemment, les scaRNP dirigent la pseudouridylation et la 2'-O-méthylation des snRNA (Jady, Darzacq *et al.* 2003), et la télomérase est responsable du maintien de la séquence répétitive des extrémités chromosomiques (Collins 2006).

### 1.7.1 Autres protéines associées à la hTR

#### 1.7.1.1 TERT

La RNP télomérase héberge également des protéines spécifiques dont une transcriptase inverse. Bien que plusieurs autres protéines sont nécessaires à la maturation et l'activité de la télomérase *in vivo*, la transcriptase inverse produite dans des réticulocytes de lapin et l'ARN sont suffisants pour l'obtention d'activité *in vitro* (Weinrich, Pruzan *et al.* 1997). La transcriptase inverse d'humain (hTERT) interagit indépendamment avec le pseudonoeud et les



régions conservés 4 et 5 (CR4-CR5) de hTR (voir Figure 1.10), plus précisément les hélices p5 et p6 ainsi que la tige-boucle p6.1 (Autexier, Pruzan *et al.* 1996; Mitchell et Collins 2000; Tesmer, Ford *et al.* 1999). L'hélice de la tige boucle p6.1 est essentielle à la liaison de TERT alors que la boucle terminale est essentielle à l'activité de la télomérase (Chen, Opperman et Greider 2002).

#### 1.7.1.2 Ku70/80

L'hétérodimère Ku70/80 interagit avec la tige-boucle 3' du domaine H/ACA de hTR, ainsi qu'avec TERT, l'ADN télomérique et les facteurs de liaison de ce dernier, TFR1 et TRF2 (Bianchi et de Lange 1999; Chai, Ford *et al.* 2002; Hsu, Gilley *et al.* 2000; Lees-Miller et Meek 2003; Song, Jung *et al.* 2000). De plus, Ku70/80 est associée avec l'activité de la télomérase. La protéine kinase "ADN-dépendante" a été reliée à la maintenance des télomères. Elle est impliquée dans la réparation de cassure double brin de l'ADN via la voie de jonction non homologue des extrémités et requiert également la présence du dimère Ku70/80 (d'Adda di Fagagna, Teo et Jackson 2004; Gilley, Tanaka *et al.* 2001; Goytisolo, Samper *et al.* 2001).

#### 1.7.1.3 PINX1

La protéine PINX1 est un régulateur négatif de l'allongement des télomères et interagit avec hTERT et hTR. L'interaction préalable de PINX1 avec hTERT est nécessaire à l'interaction de PINX1 et hTR (Banik et Counter 2004). Cette inhibition de l'allongement est attribuée au domaine C-terminal qui est absent de son orthologue de levure Gno1p. Gno1p est impliqué dans la maturation du rRNA et dans la maturation des extrémités 3' des snoRNA à boîtes C/D U18 et U24. PINX est capable de compléter une délétion de Gno1p, ce qui suggère également une fonction dans la maturation du rRNA et/ou des snoRNA à boîtes C/D pour PINX1 (Guglielmi et Werner 2002).

#### 1.7.1.4 hnRNP

Les composantes protéiques C1 et C2 des ribonucléoprotéines hétérogènes (hnRNP) s'associent spécifiquement avec une série d'uridines situées directement en 5' de la matrice télomérique de hTR (pseudonoeud). Des immunoprécipités des protéines hnRNP C1 et C2 contiennent l'activité télomerase, les deux protéines localisent avec des facteurs liant les télomères (TRF1 et TRF2) et ces localisations corrént avec l'accessibilité de la télomerase aux télomères (Ford, Suh *et al.* 2000). Le pseudonoeud de hTR interagit aussi avec les protéines hnRNP A1 et A2, lesquelles sont également retrouvées associées aux télomères. Ces interactions corrént également avec l'accessibilité de la télomerase aux télomères (Fiset et Chabot 2001; Ford, Wright et Shay 2002; LaBranche, Dupuis *et al.* 1998; Moran-Jones, Wayman *et al.* 2005).

#### 1.7.1.5 TEP1

La protéine TEP1, originalement caractérisée en association avec hTR, n'est pas nécessaire à l'activité télomerase *in vitro* et *in vivo* (Kickhoefer, Stephen *et al.* 1999; Liu, Snow *et al.* 2000). TEP1 est également une constituante des RNP Vault dont la fonction demeure inconnue, bien qu'une relation entre la résistance aux drogues et les particules Vault est établie (Steiner, Holzmann *et al.* 2006). Ces particules ont une masse de 13MDa et leur cristal dévoile qu'elles ont une structure de baril, dont l'intérieur est assez grand pour accommoder un ribosome entier (Kong, Siva *et al.* 2000; Kong, Siva *et al.* 1999). Elles sont formées par quatre protéines, MVP (70% de la masse des Vaults), VPARP (une polymérase polyADP-ribose), TEP1 et l'autoantigène La, ainsi que d'un petit ncRNA nommé vRNA qui est présent en 16 copies par particule chez le rat (Kedersha et Rome 1986; Kickhoefer, Poderycki *et al.* 2002; Kickhoefer, Searles *et al.* 1993; Kickhoefer, Siva *et al.* 1999; Kickhoefer, Stephen *et al.* 1999; Stephen, Raval-Fernandes *et al.* 2001). L'homologue de TEP1 dans *Tetrahymena thermophila* (p80) présente une forte homologie avec la protéine Ro60, une protéine impliquée dans le contrôle de qualité du repliement d'ARN (Bateman et Kickhoefer 2003; Macrae et Doudna 2005). Dans le même sens, p80 et TEP1 pourraient être impliquées dans le recyclage ou la dégradation de RNP. Finalement, des souris TEP1 (-/-) ont

des télomères de longueur normale, et ne présentent pas de problèmes de développement comparativement à des souris VPAR et MVP (-/-) (Berger, Steiner *et al.* 2009).

#### 1.7.1.6 La

L'autoantigène La est impliqué dans plusieurs processus cellulaires incluant la maturation des RNP, la traduction des mRNA contenant un site interne de reconnaissance des ribosomes (IRES), la stabilisation des mRNA et la terminaison de la transcription (Maraia et Intine 2001). Cette protéine lie une série d'uridines située en 3' des transcrits de l'ARN polymérase III (Chambers et Keene 1985) et certains transcrits de l'ARN polymérase II (Kufel, Allmang *et al.* 2000; Kurilla et Keene 1983; Madore, Wieben et Pederson 1984; Xue, Robinson *et al.* 2000). La protéine p43 des Euplotes possède une homologie avec La et elle est nécessaire pour l'ancrage de la télomérase à la matrice nucléaire (Mollenbeck, Postberg *et al.* 2003). Les fragments 1-250 et 250-451 de hTR peuvent interagir séparément avec La d'humain *in vitro* et l'activité télomérase peut être isolée en immunoprécipitant La. Cependant, sa surexpression dans des cellules en culture corrèle avec un raccourcissement des télomères (Ford, Shay et Wright 2001). Elle localise dans le cytoplasme, le noyau et même le nucléole (Wolin et Cedervall 2002).

#### 1.7.1.7 Staufen et L22

Des interactions entre la protéine liant l'ARN double brin Staufen et la protéine ribosomique L22 furent découvertes en triple hybride avec le pseudonoeud de hTR et confirmées *in vivo* avec hTR endogène (Le, Sternglanz et Greider 2000). Staufen est retrouvée associée aux ribosomes et à la tubuline dans des cellules immortelles (Luo, Duchaine et DesGroseillers 2002), ainsi que dans des granules d'ARN des neurones de l'hippocampe (Kohrmann, Luo *et al.* 1999) et elle serait associée à la régulation de la traduction lors du transport d'ARN. La protéine L22 est un constituant de la grande sous-unité ribosomique et n'est pas conservée chez les procaryotes (Nakao, Yoshihama et Kenmochi 2004). La fonction de L22 dans ces complexes demeure inconnue.

Parmi toutes ces protéines dont une interaction fut démontrée avec hTR, il est possible que les interactions entre les protéines La, Staufén, L22 ou encore TEP1 et la télomérase ne soient que le produit d'un réarrangement des RNP dû à des conditions de purification trop astringentes ou encore dû à l'abondance de ces protéines dans les extraits cellulaires utilisés lors de reconstitutions (Collins 2006).

## 1.8 Autres protéines communes aux RNP C/D et H/ACA

### 1.8.1 Pontine et Reptine

Les deux ATPases Pontine et Reptine sont étroitement apparentées et sont souvent retrouvées dans les mêmes complexes macromoléculaires. Les deux protéines sont essentielles à l'activité de plusieurs complexes de remodelage de la chromatine et sont impliquées dans la régulation de la transcription et la réparation de dommage à l'ADN. Des interactions directes entre Pontine et la dyskérine, ainsi qu'avec TERT furent démontrées. La déplétion de Pontine ou de Reptine chez l'humain résulte en la réduction des niveaux de dyskérine et hTR. Pontine et Reptine seraient donc recrutées co-transcriptionnellement aux RNP H/ACA via l'interaction entre Pontine et la dyskérine, mais leur fonction exacte dans ces complexes demeure inconnue (Baek 2008; Venteicher, Meng *et al.* 2008). En plus d'être impliquée dans l'assemblage de RNP H/ACA, il est possible que Pontine soit également impliquée dans l'assemblage de RNP C/D comme c'est le cas dans la levure (King, Decatur *et al.* 2001).

### 1.8.2 Nopp140

Nopp140 est une phosphoprotéine nucléolaire également présente dans les corps de Cajal et elle peut s'associer aux RNP HACA matures sans inhiber leur activité. Elle fut à l'origine retrouvée associée à l'homologue de la dyskérine (NAP57) chez le rat. Cette interaction pourrait solliciter plusieurs composantes des RNP H/ACA, protéines ou ARN, car elle n'a pu être reproduite avec les composantes séparées par double-hybride et triple-hybride, respectivement. De plus, cette interaction semble nécessiter la phosphorylation de Nopp140.

Son association aux snoRNP H/ACA est également indépendante de l'activité de ces derniers (Meier et Blobel 1994; Wang, Query et Meier 2002; Yang, Isaac *et al.* 2000). Nopp140 interagit aussi avec les RNP C/D et pourrait avoir une fonction de chaperonne car sa déplétion entraîne une perte des ARN à boîtes C/D et H/ACA du nucléole et des corps de Cajal (Isaac, Yang et Meier 1998; Yang, Isaac *et al.* 2000). Nopp140 est aussi associée au précurseur et à la forme mature de U3 dans un complexe de maturation nucléoplasmique et n'est pas associé à U3 dans le nucléole (Watkins, Lemm *et al.* 2004). Sa fonction pourrait également intervenir dans le transport nucléoplasme / corps de Cajal / nucléole des scaRNP et snoRNP (Isaac, Yang et Meier 1998; Meier et Blobel 1992).

## 1.9 Protéines communes aux snRNP et/ou aux scaRNP H/ACA

### 1.9.1 Complexes SMN et Sm

La protéine ubiquitaire "survival of motor neuron" (SMN) est associée à d'autres protéines nommées Gémines dans un complexe impliqué dans la biogénèse de snRNP, snoRNP et de la télomérase des vertébrés (Bachand, Boisvert *et al.* 2002; Paushkin, Gubitz *et al.* 2002). Le complexe SMN est requis pour l'assemblage du complexe Sm, qui est commun aux snRNP du spliceosome majeur (Fischer, Liu et Dreyfuss 1997; Meister, Buhler *et al.* 2001; Pellizzoni, Yong et Dreyfuss 2002). Le complexe SMN est formé de SMN et de 7 Gémines (Gemine2-8) comprenant une ARN hélicase de la famille «DEAD box» (Gemine3). Toutes les protéines du complexe SMN à l'exception de la Gemine2 peuvent interagir avec plusieurs protéines du complexe Sm. La distribution du complexe Sm est cytoplasmique et nucléoplasmique, à l'exception de la Gemine4 qui présente aussi une distribution nucléolaire (Baccon, Pellizzoni *et al.* 2002; Carissimi, Saieva *et al.* 2006; Charroux, Pellizzoni *et al.* 1999; Charroux, Pellizzoni *et al.* 2000; Friesen et Dreyfuss 2000; Gubitz, Mourelatos *et al.* 2002; Liu et Dreyfuss 1996; Liu, Fischer *et al.* 1997; Pellizzoni, Baccon *et al.* 2002). Le complexe Sm consiste en un anneau heptamérique de protéines Sm (pentamère SmD<sub>1</sub>/SmD<sub>2</sub>/SmE/SmF/SmG avec le dimère SmB/SmD<sub>3</sub>) qui s'assemble sur la séquence consensus simple brin AUUUUUG (site Sm) des snRNA U1, U2, U4 et U5 (Luhrmann 1990; Luhrmann, Kastner et Bach 1990; Will et Luhrmann 2001). Une tige-boucle (hélice

comportant jusqu'à 12 paires de bases et une boucle de 4 à 17 nt) située en aval du site Sm, à l'exception du snRNA U1, est nécessaire à la liaison de SMN au snRNA lors de l'assemblage de l'anneau Sm sur ce dernier (Golembe, Yong et Dreyfuss 2005). SMN interagit avec SmB, SmD<sub>1</sub> et SmD<sub>3</sub> via leurs domaines GAR qui sont diméthylés, similairement à l'interaction observée entre SMN et GAR1 / fibrillarine (Friesen, Massenet *et al.* 2001; Jones, Gorzynski *et al.* 2001; Meister, Eggert et Fischer 2002; Pellizzoni, Baccon *et al.* 2001; Whitehead, Jones *et al.* 2002). Les protéines SmB et SmD<sub>3</sub> sont également spécifiquement associées à la boîte CAB des scaRNA H/ACA et l'absence d'interaction des autres protéines Sm nécessaire à la formation d'un anneau Sm suggère une architecture de RNP différente, possiblement médiée par GAR1, SMN et WDR79 (voir section 1.9.2) (Fu et Collins 2006).

#### 1.9.1.1 Diméthylation des protéines Sm, de la fibrillarine et GAR1

La protéine arginine méthyltransférase 5 (PRMT5) est la seule PRMT connue capable de catalyser la diméthylation symétrique des résidus arginine dans le cytoplasme. Elle fonctionne dans un complexe actif de 20S localisé dans le cytoplasme. Ce complexe est formé de PRMT5, de pICln, de MEP50 et des protéines SmB, SmD<sub>1</sub> et SmD<sub>3</sub> qui sont alors diméthylés symétriquement. Cette diméthylation symétrique est nécessaire à l'assemblage de l'anneau Sm et leur interaction avec les Gemines (Branscombe, Frankel *et al.* 2001; Friesen, Paushkin *et al.* 2001; Friesen, Wyce *et al.* 2002). La protéine MEP50 interagit également avec FSP1, une kinase spécifique au CTD de l'ARN polymérase II reliant ainsi l'élongation de la transcription avec l'assemblage des snRNP (Licciardo, Amente *et al.* 2003), des snoRNP introniques (Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Richard, Kiss *et al.* 2006) et probablement celle des scaRNP et de la télomérase.

La diméthylation des domaines GAR de GAR1 et de la fibrillarine est asymétrique et est probablement effectuée par PRMT1, une méthyltransférase nucléaire. Contrairement à la méthylation symétrique des protéines Sm, la diméthylation asymétrique de GAR1 et fibrillarine n'influence pas l'interaction de ces dernières avec SMN (Friesen, Paushkin *et al.* 2001; Lin, Huang *et al.* 2002). De plus, les domaines GAR de GAR1 ne sont pas essentiels à sa localisation nucléolaire. Cependant chacun de ces domaine peut interagir séparément avec

SMN (Girard, Bagni *et al.* 1994; Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000; Xu, Henry *et al.* 2003). La fonction de la diméthylation asymétrique de GAR1 et de la fibrillarine demeure inconnue.

### 1.9.2 WDR79

Une interaction entre la protéine WDR79 et le complexe formé de NAF1, dyskérine et Pontine fut démontrée en présence de RNase A. La WDR79 interagit également avec la boîte CAB des scaRNA et de hTR, et cette interaction est dépendante de la boîte ACA. Ceci suggère que les RNP H/ACA doivent être assemblées pour que WDR79 puisse s'associer aux RNP. Une mutation dans la boîte CAB d'un scaRNA d'humain abolit sa liaison avec WDR79 et cause une accumulation nucléolaire au lieu des corps de Cajal. Bien que WDR79 ne soit pas essentielle à l'accumulation de hTR, la déplétion de WDR79 empêche la bonne localisation de hTR aux corps de Cajal et abroge l'interaction télomérase-télomères (Tycowski, Shu *et al.* 2009; Venteicher, Abreu *et al.* 2009).

### 1.10 Assemblage co-transcriptionnel des RNP H/ACA et C/D eucaryotiques

Bien que quelques sno/scaRNA comme hTR sont synthétisés à partir de gènes indépendants chez les mammifères, les séquences codantes de la majorité de ces ARN sont localisées dans des introns de pré-mRNA et sont donc co-transcrits avec ces derniers (Filipowicz et Pogacic 2002; Kiss 2004; Tollervey et Kiss 1997; Weinstein et Steitz 1999). Les ARN non-codants introniques sont souvent fonctionnellement reliés au gène hôte. Par exemple, plusieurs snoRNA introniques impliqués dans la maturation du rRNA sont localisés dans des introns de pré-mRNA codants pour des protéines également impliqués dans la fonction ou la biogénèse des ribosomes (Maxwell et Fournier 1995; Tollervey et Kiss 1997). Cette co-transcription assure une régulation développementale et/ou spécifique des tissus (Bachellerie, Cavaillé et Hüttenhofer 2002; Bartel 2004).

À l'exception de GAR1, les trois autres protéines H/ACA (dyskérine, NOP10 et NHP2) ainsi que le facteur d'assemblage nucléaire 1 (NAF1) sont recrutées au site de transcription d'ARN H/ACA via l'ARN pol II et s'associent au ARN naissant pour former une RNP

précurseur inactive (pré-RNP) (Ballarino, Morlando *et al.* 2005; Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Fatica, Dlakic et Tollervey 2002; Richard, Kiss *et al.* 2006; Yang, Hoareau *et al.* 2005). NAF1 possède un domaine homologue à GAR1 qui médie une interaction entre NAF1 et la dyskérine, et peut ainsi former un tétramère avec dyskérine, NOP10 et NHP2 en absence d'ARN (Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Fatica, Dlakic et Tollervey 2002; Leulliot, Godin *et al.* 2007; Rashid, Liang *et al.* 2006; Yang, Hoareau *et al.* 2005), plaçant ce domaine au même endroit que aGar1 dans le cristal de la sRNP (Figure 1.13). NAF1 est cependant beaucoup plus grosse que GAR1, et comme sa structure est indéterminée, il est difficile de prédire la place qu'elle prend au sein des RNP. Les pré-RNP H/ACA assemblées avec NAF1 sont inactives contrairement aux RNP matures contenant GAR1. Gar1 est essentielle à l'activité des RNP H/ACA, mais contrairement à NAF1, dyskérine, NOP10 et NHP2, elle n'est pas nécessaire à l'accumulation de celles-ci (Baker, Youssef *et al.* 2005; Bousquet-Antonelli, Henry *et al.* 1997; Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Dez, Henras *et al.* 2001; Fatica, Dlakic et Tollervey 2002; Henras, Henry *et al.* 1998; Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006; Lafontaine, Bousquet-Antonelli *et al.* 1998; Watkins, Gottschalk *et al.* 1998; Yang, Rotondo *et al.* 2002). Le mécanisme régissant l'échange de NAF1 pour GAR1 au sein des RNP H/ACA lors de la maturation de ces dernières demeure inconnu.

Bien qu'il n'y ait pas de preuve directe que le domaine ressemblant au domaine H/ACA de hTR est assemblé co-transcriptionnellement, il y a des évidences indirectes qui indiquent que c'est probablement le cas. Le domaine H/ACA de hTR contient tous les éléments essentiels à l'accumulation de transcrits matures de hTR (Fu et Collins 2003). Cela suggère que la maturation de l'extrémité 3' de hTR dépend de l'assemblage de ce domaine avec des protéines H/ACA spécifiques. De plus, la déplétion des quatre protéines (NAF1, dyskérine, NOP10 et NHP2) provoque la dégradation des transcrits de hTR (Fu et Collins 2007; Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006).

L'assemblage de RNP C/D est également effectuée de façon co-transcriptionnelle, mais contrairement à l'assemblage de RNP H/ACA, elle est couplée à l'épissage des introns qui les hébergent (Darzacq et Kiss 2000; Hirose, Shu et Steitz 2003; Hirose et Steitz 2001; Morlando, Ballarino *et al.* 2004). La protéine IBP60, un facteur général de l'épissage qui lie l'intron en



aval d'ARN à boîtes C/D, possède une activité hélicase qui semble promouvoir l'assemblage des RNP C/D (Hirose, Ideue *et al.* 2006). Comme NAF1, la protéine BCD1 est essentielle à l'accumulation d'ARN à boîtes C/D. Elle ne fait pas partie de RNP C/D matures et interagit avec la machinerie de la pol II. Comme GAR1 pour les ARN H/ACA, la protéine NOP56 est la seule protéine commune aux boîtes C/D qui n'est pas nécessaire à l'accumulation d'ARN à boîtes C/D chez les eucaryotes. Il se pourrait donc que NOP56 puisse remplacer BCD1 présente dans les pré-RNP pour former des RNP matures, similairement à l'échange NAF1/GAR1 au sein de RNP H/ACA (Hiley, Babak et Hughes 2005; Matera, Terns et Terns 2007; Peng, Robinson *et al.* 2003).

## **HYPOTHÈSES**

Nous savons que le domaine H/ACA de hTR est essentiel à son accumulation *in vivo*. Nous savons également que l'accumulation d'ARN H/ACA, incluant hTR, requiert la présence des protéines dyskérine, NOP10, NHP2 et NAF1. Comme ces dernières sont assemblées co-transcriptionnellement avec les ARN H/ACA et que la formation de pré-RNP est une étape initiale de la biogenèse de RNP H/ACA, nous avons donc formulé les hypothèses suivantes :

Les (ou des) mutations dans le domaine H/ACA de hTR associées à la DC peuvent provoquer un défaut d'assemblage de ce domaine en pré-RNP H/ACA

Les (ou des) mutations associées à la DC dans la dyskérine, NOP10 et NHP2 peuvent engendrer des défauts d'assemblage de pré-RNP non seulement avec le domaine H/ACA de hTR, mais avec d'autres ARN H/ACA.

## **OBJECTIFS**

Le premier objectif fut tout d'abord d'élaborer un système permettant de reconstituer des pré-RNP H/ACA avec le domaine H/ACA de hTR, ainsi qu'avec d'autres ARN H/ACA. Les objectifs secondaires découlants d'un tel système furent par la suite d'analyser l'impact de mutations associées à la DC qui sont présentes dans hTR, la dyskérine, NOP10 et NHP2, sur l'assemblage de ces pré-RNP H/ACA.

# MÉTHODOLOGIE GÉNÉRALE

## Reconstitution de complexes protéiques H/ACA

Afin de reconstituer et d'analyser les complexes protéiques, les protéines sont tout d'abord co-synthétisées et marquées au S-35 dans du lysat de réticulocytes de lapin. Les complexes sont par la suite isolés par immunoprécipitation et séparés sur gel d'acrylamide. Le gel est finalement séché et les protéines révélées par imagerie de phosphore.

## Reconstitutions de RNP H/ACA

Les RNP H/ACA sont reconstituées en incubant le mélange protéique co-synthétisé avec des ARN synthétiques marqués au P-32 avant d'isoler les RNP assemblées par immunoprécipitation. Tout comme pour l'analyse des complexes protéiques, les RNP sont séparées sur gel d'acrylamide, et révélées par imagerie de phosphore. Afin de ne visualiser que le P-32 qui émane des ARN synthétiques, il est possible de bloquer les rayons émis par de S-35 des protéines à l'aide d'un transparent placé entre le gel et l'écran de phosphore. Les surnageants des immunoprécipitations sont analysés séparément sur gel d'acrylamide dénaturant afin de s'assurer de l'intégrité des ARN.

## CHAPITRE II

### DÉVELOPPEMENT D'UN SYSTÈME *IN VITRO* DESTINÉ À ANALYSER L'ASSEMBLAGE DE PRÉ-RNP H/ACA, ET ANALYSE DE L'EFFET DE MUTATIONS DANS LE DOMAINE H/ACA DE HTR SUR SON ASSEMBLAGE EN PRÉ-RNP.

#### AVANT PROPOS

Tel que mentionné dans l'état des connaissances, il y a des évidences que la dyskérine, NOP10, NHP2 et NAF1 sont assemblées de façon co-transcriptionnelle avec les ARN H/ACA naissants pour former des pré-RNP, et que les quatre protéines peuvent former un tétramère en absence d'ARN. Afin de pouvoir répondre à l'hypothèse de départ, j'ai tout d'abord mis au point un système *in vitro* de reconstitution de protéines et pré-RNP H/ACA décrit sous la section méthodologie générale. Ce système m'a permis d'analyser les interactions entre les protéines dyskérine, NOP10, NHP2 et NAF1 d'humain. Il m'a également permis de déterminer les pré-requis protéiques nécessaires à l'incorporation de NAF1 au sein de RNP H/ACA, incluant celles assemblées avec le domaine H/ACA de hTR. J'ai par la suite pu analyser l'effet d'une série de variantes du domaine H/ACA de hTR sur l'assemblage du domaine H/ACA de hTR en pré-RNP. Ces variantes consistent en des substitutions dans les boîtes H, ACA, CAB, ainsi qu'une substitution et une délétion reliée à la DC, en plus d'une substitution reliée à l'anémie aplasique.

#### Contributions :

J'ai moi-même mis au point le système *in vitro* de reconstitution de pré-RNP, effectué les expériences et analysé les résultats sous la supervision du Dr François Dragon. J'ai également contribué à la majeure partie de la rédaction de l'article avec l'aide du Dr François Dragon.

**Dyskeratosis congenita mutations in the H/ACA domain of human  
telomerase RNA affect its assembly into a pre-RNP.**

Christian Trahan and François Dragon\*

Département des sciences biologiques and Centre de recherche BioMed,  
Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

\*Correspondence: [dragon.francois@uqam.ca](mailto:dragon.francois@uqam.ca)

Running title: DC mutations impair telomerase assembly

Keywords: Telomerase biogenesis, human telomerase RNA, dyskeratosis congenita, H/ACA  
pre-RNPs, NAF1

## 2.1 Abstract

Dyskeratosis congenita (DC) is an inherited disorder that implicates defects in the biology of telomeres, which are maintained by telomerase, a ribonucleoprotein with reverse transcriptase activity. Like all H/ACA RNAs, the H/ACA domain of nascent human telomerase RNA (hTR) forms a pre-RNP with H/ACA proteins NAF1, dyskerin, NOP10 and NHP2 *in vivo*. To assess the pre-RNP assembly of hTR mutants that poorly accumulate *in vivo*, we developed an *in vitro* system that uses components of human origin. Pre-RNPs were reconstituted with synthetic  $^{32}\text{P}$ -labeled RNAs and  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins produced in rabbit reticulocyte lysate, and immunoprecipitations were carried out to analyze RNP formation. We show that human NAF1 cannot bind directly to the H/ACA domain of hTR, and requires the core trimer dyskerin-NOP10-NHP2 to be efficiently incorporated into the pre-RNP. This order of assembly seems common to H/ACA RNAs since it was observed with snoRNA ACA36 and scaRNA U92, which are predicted to guide pseudouridylation of 18S rRNA and U2 snRNA, respectively. However, the processing H/ACA snoRNA U17 did not conform to this rule, as NAF1 alone was able to bind it. We also provide the first evidence that DC-related mutations of hTR C408G and  $\Delta 378\text{-}451$  severely impair pre-RNP assembly. Integrity of boxes H and ACA of hTR are also crucial for pre-RNP assembly while the CAB box is dispensable. Our results offer new insights into the defects caused by some mutations located in the H/ACA domain of hTR.

## 2.2 Introduction

Dyskeratosis congenita (DC) is an inherited disorder characterized by a variety of phenotypes, and afflicted subjects usually die of bone marrow failure. DC patients show signs of premature aging, and they are more susceptible to develop cancers. There is evidence that all DC patients have some defects in telomere biology, and that those defects affect the renewing capabilities of hematopoietic stem cells. Furthermore, all DC causal mutations identified to date are found in telomerase components or in telomere stabilizing components (Hockemeyer, Palm *et al.* 2008; Savage, Giri *et al.* 2008; Vulliamy, Beswick *et al.* 2008; Vulliamy et Dokal 2008).

Telomerase is a ribonucleoprotein with reverse transcriptase activity responsible for de novo synthesis and maintenance of telomeric DNA, the chromosomal termini (Collins 2006). In vertebrates, the 5' half of telomerase RNA forms a conserved pseudoknot structure that harbors the telomere template, and the 3' half evolved as an H/ACA-like domain (Chen et Greider 2004; Mitchell, Cheng et Collins 1999). The H/ACA domain is structurally similar to a large family of small nucleolar RNAs (snoRNAs) and small Cajal body-specific RNAs (scaRNAs). All H/ACA RNAs share a common fold consisting of a hairpin followed by a single-stranded hinge containing box H [consensus sequence ANANNA, where N is any nucleotide (nt)], another hairpin, and a single-stranded tail with the ACA box situated three nt from the 3' end (Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss 1997). Most H/ACA snoRNAs act as guides for the pseudouridylation of rRNA and localize to nucleoli while scaRNAs guide the pseudouridylation of spliceosomal small nuclear RNAs and localize to Cajal bodies. The sno/scaRNAs families also include another RNA class characterized by two conserved motifs called boxes C and D; most C/D sno/scaRNAs act as guides for the site-specific 2'-O-methylation of target RNAs (Kiss 2004; Matera, Terns et Terns 2007).

In humans, all H/ACA sno/scaRNAs are encoded within introns of pre-mRNAs and the processed mature RNAs are devoid of a 5' cap structure (Kiss, Jady *et al.* 2004). In contrast, human telomerase RNA (hTR) is transcribed by RNA polymerase II (pol II) from its own promoter and the mature RNA (451 nt) bears a TMG-cap at the 5' end. Although there is no

evidence that the H/ACA domain of hTR guides pseudouridylation reactions, this domain is essential for hTR stability and accumulation in vivo (Collins 2006). Within this domain, the terminal loop of the conserved region 7 (CR7) harbors a Cajal body retention signal (CAB box) that is shared by H/ACA scaRNAs, classifying hTR as a scaRNA rather than a snoRNA (Figure 1). The consensus sequence of the CAB box is ugAG, where the first two residues are varying and the last two are highly conserved (Jady, Bertrand et Kiss 2004; Richard, Darzacq *et al.* 2003). The CAB box allows Cajal body localization but it is not involved in 3' end formation of the RNA, indicating that the two processes are functionally independent (Theimer, Jady *et al.* 2007). The CR7 also contains key features required for RNP assembly, such as the base pairing between U411 and G417, and an unpaired U418 in the terminal loop. In addition, conservation of base pairing and the internal loop of the P8 stem are also essential for 3' end processing of hTR (Fu et Collins 2003).

Human H/ACA RNPs share a common set of core proteins named GAR1, NHP2, NOP10 and dyskerin, a pseudouridine synthase that catalyzes the pseudouridylation reaction (Matera, Terns et Terns 2007). GAR1 is a late assembly component that is present only in mature, functional RNPs, and it is not detected at the transcription site of an H/ACA snoRNA (Darzacq, Kittur *et al.* 2006). In contrast, dyskerin, NHP2 and NOP10 are early assembly components and they interact with nascent H/ACA snoRNA at the transcription site (Darzacq, Kittur *et al.* 2006). Formation of these immature and inactive RNPs (or pre-RNPs) requires the assistance of the nuclear assembly factor-1 (NAF1) at the transcription site (Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006; Yang, Hoareau *et al.* 2005). Unlike GAR1, NAF1 is not present in mature H/ACA RNPs and it is not detected in nucleoli and Cajal bodies, the compartments where H/ACA RNPs function (Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006). It has been proposed that NAF1 must be replaced by GAR1 to make functional RNPs but the exchange mechanism remains elusive. In yeast, depletion of Naf1p, Nhp2p, Nop10p or Cbf5p (the homologue of dyskerin) causes a decrease in levels of H/ACA snoRNAs ((Dez, Noaillac-Depeyre *et al.* 2002) and references within). Naf1p interacts with the pol II machinery and could be responsible for coupling transcription with pre-RNP formation (Ballarino, Morlando *et al.* 2005; Fatica, Dlakic et Tollervey 2002; Yang, Hoareau *et al.* 2005). These functional interactions are likely conserved in humans



because human NAF1 can complement a yeast strain depleted of Naf1p (Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006). Dyskerin was also found associated with an unspliced nascent H/ACA snoRNA, which requires the presence of NAF1 to accumulate, just as hTR does (Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006; Richard, Kiss *et al.* 2006).

Some mutations found in the H/ACA domain of hTR are associated with an autosomal dominant form of DC. One mutation leading to DC is the C408G tranversion, which is located in helix P8b of CR7 (see Figure 1); this mutation alters the structure of CR7, resulting in the loss of proper processing signals (Theimer, Finger *et al.* 2003; Theimer, Jady *et al.* 2007). Another mutation in hTR leading to DC is the deletion of nucleotides 378 to 451 ( $\Delta$ 378-451), which removes the entire 3' stem, positioning box H at the 3' extremity. Accumulation of mutants C408G and  $\Delta$ 378-451 is highly reduced in vivo, as shown by Northern hybridization and RT-PCR experiments. However, normal telomerase activity was obtained for both mutants in an in vitro system or when RNAs were over-expressed in hTR negative cells, indicating that these two DC mutations affect the biogenesis of telomerase rather than its activity. Other mutations in hTR are related to aplastic anemia (AA), such as the G450A mutant that was found to accumulate near wild type level in vivo (Fu et Collins 2003; Ly, Calado *et al.* 2005; Marrone, Stevens *et al.* 2004; Vulliamy, Marrone *et al.* 2001).

NAF1, dyskerin, NOP10 and NHP2 are protein components of H/ACA pre-RNPs. We have developed an in vitro system to test their interaction with the H/ACA domain of hTR and its mutant derivatives. Here we show that NAF1 cannot bind the H/ACA domain of hTR by itself, and requires the presence of the trimer dyskerin-NOP10-NHP2 to be efficiently incorporated into the pre-RNP. We also show that pre-RNP assembly is impaired by some DC-related mutations.

## 2.3 Results and Discussion

To assess the interactions between human H/ACA proteins as well as RNP formation of the H/ACA domain of hTR, we used  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins produced in rabbit reticulocyte lysate (RRL) and  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA fragments of hTR transcribed in vitro, and we carried out a series of immunoprecipitation experiments (IPs) against dyskerin or NAF1.

### 2.3.1 The precursor complex of human H/ACA proteins assembles correctly in

#### RRL

We first analyzed the expression level of each protein-encoding plasmid individually in RRL; the proteins were analyzed by denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (Figure 2A, lanes 1-5). Fibrillarin, a protein associated with box C/D sno/scaRNAs, was used as a negative control for IPs. Human NOP10 failed to accumulate in RRL (data not shown). The RRL is known to work best with proteins in the range of 15-100 kDa, while smaller proteins like human NOP10 may be targeted for degradation by an ubiquitin-dependent pathway (TenHarmsel 2004). To circumvent this problem the HA tag was inserted at the N-terminus of human NOP10; because HA-NOP10 accumulated well in RRL (Figure 2A, lane 5), we used this construct for all experiments and we hereafter refer to it as NOP10.

We first examined if the order of assembly of human H/ACA proteins occurs as previously reported in other heterologous systems (Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Wang et Meier 2004); we carried out IPs against dyskerin on RRL mixtures containing all co-translated proteins, or different combinations of those (Fig. 2A, lanes 6-23). IPs showed that all four H/ACA proteins (dyskerin, NOP10, NHP2 and NAF1) can form a tetramer, and that the C/D protein fibrillarin was not co-immunoprecipitated (Figure 2A, lane 7). In the absence of NAF1 the core trimer is readily formed (Figure 2A, lane 11), indicating that NAF1 is not required for its assembly. Formation of this core trimer is mediated by NOP10 because omission of NOP10 in the RRL impairs NHP2 co-immunoprecipitation with dyskerin, regardless of the presence of NAF1 (Figure 2A, lanes 15 and 17). Conversely, NOP10 was

co-immunoprecipitated with dyskerin from an RRL mixture lacking NHP2 (Figure 2A, lane 19). Co-immunoprecipitation of dyskerin and NAF1 in the absence of NHP2 and/or NOP10 indicated that NAF1 interacts directly with dyskerin (Figure 2A, lanes 13, 15 and 21). These data suggest that the precursor complex formed by human proteins dyskerin, NOP10, NHP2 and NAF1 can be assembled *in vitro* in the same way as previously reported (Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Wang et Meier 2004). The weak IP background found with a mixture lacking dyskerin is likely caused by low levels of endogenous H/ACA proteins present in RRL (see Figure 2A, lane 9). Indeed, this background was not observed in control IPs with beads alone (Figure 2A, lane 23) nor with anti-myc monoclonal antibody (data not shown). It was not possible to determine the molar ratio of co-immunoprecipitated proteins because H/ACA protein complexes of high molecular weight were seen in every IPs. Disruption of these protein complexes with harsher conditions prior to PAGE failed (data not shown), suggesting that H/ACA proteins can form highly stable complexes, in line with previous observations (Henras, Capecyrou *et al.* 2004; Leulliot, Godin *et al.* 2007).

### 2.3.2 H/ACA proteins of the pre-RNP assemble specifically on the H/ACA domain of hTR

To test the ability of the tetramer complex to assemble with the H/ACA domain of hTR, we used a radiolabeled RNA fragment encompassing residues 204 to 451 of hTR (hTR204; see Figure 1). When RRL mixtures containing all proteins were subjected to dyskerin or NAF1 IPs, hTR204 co-immunoprecipitated efficiently (Figure 2B bottom panels, lanes 3 and 13, respectively). Specificity of this interaction was confirmed using the box C/D snoRNA U3 as negative control; U3 does not bind H/ACA proteins and it was not co-immunoprecipitated in our assays (Figure 2B, lanes 8 and 18). Thus, H/ACA pre-RNP assembly occurs specifically in our RRL system. RNAs from IP supernatants were analyzed separately on 8% denaturing polyacrylamide gels; there were no differences in RNA quantities or integrity that could have explained the reduced RNA levels in the IPs (Figure 2C). The background of hTR204 seen in the IPs carried out in absence of either dyskerin (Figure 2B, lane 5) or NAF1 (Figure 2B, lane 15) correlates with the low background level of

H/ACA proteins in RRL, as shown in the top panels of Figure 2B (lanes 5, 10, 15 and 20) and in Figure 2A (lane 9). We also carried out dyskerin IPs and NAF1 IPs with RRL mixtures containing only labeled hTR204 (no translated protein) and obtained the same background levels of hTR204, however, control IPs made with anti-NAF1 beads incubated with labeled RNA alone (no RRL present) showed virtually no background (data not shown). These control experiments revealed that RRL contains traces of H/ACA proteins that can interact together (see Figure 2A) and with the radiolabeled RNA, thus producing a low level background in our experiments.

### 2.3.3 NAF1 assembly on the H/ACA domain of hTR is mediated by the core trimer

A series of dyskerin IPs indicated that the core trimer dyskerin-NOP10-NHP2 is necessary and sufficient to bind hTR204 in RRL (see Figure 3A), in accordance with the report of Wang and Meier (2004) for the rat counterparts. However, NAF1 was not included in these previous experiments, and here we further found that NAF1 could be co-immunoprecipitated with hTR204 and dyskerin only when NOP10 and NHP2 were present (Figure 3A). These results suggest that NAF1 requires the core trimer to be assembled on the H/ACA domain of hTR. Because NAF1 interacts with dyskerin in absence of RNA (Figure 2A), dyskerin IPs did not clearly demonstrate the association of NAF1 with hTR204. To clarify this point, we carried out NAF1 IPs with radiolabeled hTR204 incubated in RRL mixtures bearing all proteins or different combinations of those (Figure 3C). We observed that NAF1 cannot bind directly to hTR204 (Figure 3C, lanes 1-2), however, the RNA was efficiently co-immunoprecipitated with NAF1 when all the other H/ACA proteins were present in the translation mixture (Figure 3C, lanes 3-4). The omission of any protein that forms the core trimer dyskerin-NOP10-NHP2 resulted in a RNA signal weaker or equal to the background level obtained in the absence of NAF1 (Figure 3C, bottom panel, lanes 5-12). RNAs from IP supernatants were analyzed separately, and there was no sign of degradation to explain the reduced RNA levels in IPs (Figures 3B and 3D). Thus, NAF1 cannot bind directly to hTR204 and needs to associate with the core trimer to be incorporated in the RNP. This finding is supported by the lack of conserved electrostatic positive patch in NAF1 that could define an RNA-binding motif (Leulliot, Godin *et al.* 2007). Our data differ from gel

retardation experiments showing that bacterially produced yeast Naf1p binds directly to snR36 snoRNA (Fatica, Dlakic et Tollervy 2002). To determine if our results were specific to hTR, we tested different H/ACA RNAs in the RRL assay. We used the human homologue of yeast snR36, ACA36, which is predicted to guide pseudouridylation of 18S rRNA (Kiss, Jady *et al.* 2004), U92, a human scaRNA predicted to guide pseudouridylation of U2 snRNA (Darzacq, Jady *et al.* 2002), and U17, a human snoRNA involved in early pre-rRNA processing reactions (Atzorn, Fragapane et Kiss 2004; and references therein). As expected, ACA36, U92 and U17 co-immunoprecipitated with NAF1 when incubated in a mixture containing all the H/ACA proteins (Figure 3E, bottom panels, lanes 3, 10 and 17). However, when these RNAs were incubated with NAF1 alone, only U17 co-immunoprecipitated with NAF1 (Figure 3E, lane 21), in marked contrast with ACA36 and U92, which were virtually absent from immunoprecipitates (Figure 3E, bottom panels, lanes 7 and 14; the  $^{32}\text{P}$  signal for ACA36 and U92 RNAs was equal or lower than the background level seen in the IPs carried out with the mixture lacking NAF1). Identical results were obtained with human snoRNA ACA36B, a paralogue of ACA36 (data not shown). Analysis of RNAs in IP supernatants ruled out the possibility that absence of RNAs in immunoprecipitates was due to degradation (Figure 3F). Overall, our data suggest that direct binding of human NAF1 to H/ACA RNAs is not a common theme, and U17 could be the exception that proves the rule. We also noted that NAF1 IPs with HeLa cell extracts co-immunoprecipitated much more U17 than other H/ACA sno/scaRNAs (Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006). Intron-encoded U17 is unique in that it has no pseudouridylation target and it is one of the few snoRNAs that participate in pre-rRNA processing reactions. Moreover, U17 has structural features not found in other H/ACA snoRNAs, and it has been proposed that it might interact with U17-specific proteins (Atzorn, Fragapane et Kiss 2004; Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000). One possible explanation for our results is that these features allow a distinct order of assembly of the U17 pre-RNP. Alternatively, it is possible that an unidentified U17-specific protein present in the RRL could mediate the interaction between U17 and NAF1.

At the level of protein-protein interactions, we did not observe any direct interaction between NAF1 and NHP2 in our system. As demonstrated in Figure 2, endogenous rabbit H/ACA proteins are present in RRL, and this could explain why trace amounts of *in vitro*

translated yeast Nhp2p were pulled down with GST-Naf1p (Fatica, Dlakic et Tollervey 2002), and why small amounts of human NAF1 co-immunoprecipitated with rat HA-NOP10 in the presence of rat NHP2 (Darzacq, Kittur *et al.* 2006).

Taken together, our data indicate that the core trimer dyskerin-NOP10-NHP2 is necessary and sufficient to bind the H/ACA domain of hTR, and that NAF1 requires the core trimer to be incorporated in the pre-RNP; these results are in agreement with *in vivo* studies showing that all four proteins were localized at the transcription site of an H/ACA snoRNA, and the observation that knocking down dyskerin impaired localization of NAF1 at the transcription site (Darzacq, Kittur *et al.* 2006).

#### 2.3.4 The Cajal body localization signal is not required for pre-RNP assembly

We next assessed pre-RNP assembly of hTR204 in the context of a mutated H box (AGAGGA→UGAGGA), a mutated ACA box (ACA→GCA), a mutated CAB box (UGAGG→UGACC) or inverted nucleotides 413 to 416 (inv413-416) of the CR7 terminal loop encompassing the last two nucleotides of the CAB box (UGAGGCU→UGUCGA). This inversion maintains the U411-G417 base pair, and the G418 bulge that are required for processing and accumulation of the H/ACA domain *in vivo* (Theimer, Jady *et al.* 2007). Since our experiments indicated that NAF1 requires the trimer dyskerin-NOP10-NHP2 to be efficiently assembled on the H/ACA domain of hTR (see Figure 3C), we decided to carry out NAF1 IPs on RRL mixtures containing all proteins incubated with wild-type hTR204 or its mutant derivatives. Mutations in box H or box ACA severely impaired RNP formation (Figure 4A, bottom panel, lanes 4 and 10, respectively). As mutants of boxes H or ACA do not accumulate *in vivo* (Mitchell, Cheng et Collins 1999), these results provide the first evidence linking accumulation defects with impaired or inefficient pre-RNP assembly. In contrast with mutations in conserved motifs H and ACA, the mutated CAB box and the inversion of the CR7 terminal loop (inv413-416) did not affect pre-RNP assembly (Figure 4A, bottom panel, lanes 6 and 8), consistent with the *in vivo* study showing that H/ACA processing and accumulation of hTR are independent of the CAB box element (Theimer, Jady *et al.* 2007). RNAs from IP supernatants were analyzed on denaturing polyacrylamide



gels; there was no RNA degradation that could account for the reduced RNA levels in the IPs (data not shown).

### 2.3.5 DC mutations in the H/ACA domain of hTR impair pre-RNP assembly

A number of disease-causing mutations map to the H/ACA domain of hTR. To determine if some of these mutations affect pre-RNP assembly, we analyzed hTR H/ACA pre-RNP assembly of DC-related mutants C408G and the 3' stem deletion ( $\Delta$ 378-451) in our RRL system, as well as the AA-related mutation G450A (see Figure 1). The G450A mutant showed no detectable defects for RNP assembly (Figure 4B, bottom panel, lane 8). Such result was expected because the G450A mutant accumulates normally in vivo (Ly, Calado *et al.* 2005), suggesting that the first steps of telomerase biogenesis occur correctly with this mutant. In contrast, mutations C408G and  $\Delta$ 378-451 greatly impaired RNP assembly (Figure 4B, bottom panel, lanes 4 and 10). Note that mutant  $\Delta$ 378-451 corresponds to the 5' hairpin followed by box H of the H/ACA domain of hTR, a region that apparently lacks essential elements required for RNP formation. In contrast, a fragment encompassing only the 3' hairpin followed by box ACA formed an RNP in RRL and could be immunoprecipitated (data not shown), in accordance with previous studies showing that this region of hTR contains critical assembly elements (Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000). The defect caused by the C408G point mutation, which disrupts the CR7 terminal helix and loop structure (Theimer, Finger *et al.* 2003; Theimer, Jady *et al.* 2007), could be specifically overcome by the compensatory mutation G421C (Figure 4B, bottom panel, lane 6) that restores the 408:421 base pairing and the structure of the CR7, as well as the activity of telomerase (Ly, Calado *et al.* 2005). Again, RNAs from all IP supernatants were analyzed separately on denaturing polyacrylamide gels; there were no differences in RNA quantities or integrity that could have explained the reduced RNA levels in the IPs (data not shown).

Our results are in accordance with the study of Theimer *et al.* (2007) who showed that the C408G mutant localized in dot-like structures presumed to be transcription sites of hTR, as if the mutant could not be processed into mature RNPs. However, when Theimer *et al.* (2007) expressed only the H/ACA domain portion encompassing nt 210-451 from a  $\beta$ -globin

intron, the C408G mutant RNA was processed up to C225 at its 5' end, and it formed RNPs that localized in Cajal bodies. In this case, 5' end processing of the fragment promotes an alternative structure of the 5' stem that may be assembled differently than in the context of full-length hTR. We verified the integrity of the hTR204 fragment in our RRL system: RNAs were recovered from NAF1 IPs and analyzed on a sequencing gel. Trimming of hTR204 RNA up to C225 would be easily visualized on a sequencing gel, as the processed fragment would migrate faster than the input RNA. As shown in Figure 4C (cf. lanes 1, 2 and 3), hTR204 is not processed in our system. Therefore, this difference in 5' end processing of the H/ACA domain could account for the RNP assembly/accumulation discrepancy between our study and the study of Theimer *et al.* (2007). It is not known if the 5' processed H/ACA domain of hTR mutant C408G expressed from the  $\beta$ -globin intron can be co-immunoprecipitated with H/ACA proteins, or if alternative RNPs are formed in that context. As the Cajal body retention signal is functionally distinct from the processing elements (Theimer, Jady *et al.* 2007), such alternative RNPs could still be imported to Cajal bodies. Another explanation could reside in the pol II machinery that may differ in composition, or have components that favor pre-RNP assembly of intronic sno/scaRNAs versus hTR.

The *in vitro* experiments reported here nicely complement *in vivo* studies. Indeed, they present more mechanistic details on the order of interactions between components of a complex that is difficult to study *in vivo*. More specifically, we showed that some DC-related mutations in the H/ACA domain of hTR impair assembly of the pre-RNP. Overall, our data provide a first glimpse as to why these mutations can cause hTR insufficiency *in vivo*, leading directly to DC and eventually bone marrow failure.



## 2.4 Materials and Methods

### 2.4.1 DNA constructs

The sequence corresponding to the open reading frame (ORF) of NAF1 was amplified by PCR from a cDNA library derived from a human Namalwa (Burkitt lymphoma) cell line (Strubin, Newell et Matthias 1995) with oligonucleotides NAF1-F (5'-GGG GGA TCC ACC ATG GAG GTA GTG GAG GCC GC-3') and NAF1-R (5'-TGG GAA GCT TCT AAT AGT AAG GTC CAA AAT GAG A-3'). The ORF encoding fibrillarin was amplified similarly with oligonucleotides fib-F (5'-GGG GAA TTC ACC ATG AAG CCA GGA TTC AGT C-3') and fib-R (5'-GGG GAA TTC TCA GTT CTT CAC CTT GGG-3'). The PCR products were cloned into BamHI-HindIII sites and EcoRI site of pcDNA3.1(-) (Invitrogen) to generate plasmids pNAF1 and pFib, which respectively encode untagged NAF1 and fibrillarin. The cDNAs encoding human dyskerin and NHP2 were subcloned from pcDNA-DKC1 and pcDNA-hNHP2 (Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000) into the EcoRI site of pcDNA3.1(-) to generate pDKC1 and pNHP2, which encode untagged dyskerin and NHP2, respectively. The ORF of NOP10 was subcloned from pcDNA-hNOP10 (Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000) into the EcoRI site of pGADT7 (Clontech) to generate pGAD-NOP10. In vitro transcription/translation of this construct with TNT T7-Quick (see below) produces an N-terminal HA-tagged NOP10 that does not contain the activation domain located upstream of the T7 RNA polymerase promoter of pGADT7. The H/ACA domain of human telomerase RNA was amplified by PCR from phTR206 (Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000) using oligonucleotide hTR204-F 5'-CCC AAG CTT **TAA TAC GAC TCA CTA TAG** GGT ACC GGG GAC CTG CGG CGG GT-3' harboring a T7 RNA polymerase promoter (bold letters) flanked by HindIII and KpnI restriction sites, and oligonucleotide hTR204-R (5'-CGG AAT TCT GCG CAT GTG TGA GCC GAG-3'), which contains an EcoRI site at its 5' end. The PCR product was digested by HindIII and EcoRI, and inserted into pUC19 to yield phTR204. Site-directed mutagenesis (Higuchi, Krummel et Saiki 1988) was performed on phTR204 to generate the mutant derivatives A372U (mutated H box), C408G, C408G-G421C, G414C (mutated CAB box) and inverted nucleotides 413 to 416 (inv413-416) of the CR7 domain. Single PCR amplification was used to obtain mutants A446G (mutated ACA box), G450A

and  $\Delta 378-451$ . The sequence of oligonucleotides used for site-directed mutagenesis are available on request. All PCR products of mutagenized hTR204 were then cleaved with *Stu*I and *Eco*RI, and swapped with the corresponding fragment of wild-type pHTR204. The cDNA encoding human U17a snoRNA was PCR amplified from pHU17(E-B) (Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000) with oligonucleotides hU17-F (5'-CCC AAG CCT TCC AAC GTG GAT ACA CC-3') and hU17-R (5'-CGG AAT TCG GCT GTT TCC TGC ATG G-3') and cloned into restriction sites *Hind*III and *Eco*RI of pBluescript SK(-) to yield pBS-U17. The cDNA encoding H/ACA snoRNA ACA36 (Kiss, Jady *et al.* 2004; Lestrade et Weber 2006) was amplified from HeLa genomic DNA with oligonucleotides ACA36-F (5'-**AAA TTA ATA CGA CTC ACT ATA** GGG AAT TCC AAA GTG TTG AGT TCA GTC C-3'; the T7 RNA polymerase promoter sequence is in bold letters) and ACA36-R (5'- GGG AAG CTT TTT GTA GGC TGG GAG GCA-3'), and cloned into restriction sites *Sma*I and *Hind*III of pUC19 to generate pACA36. The cDNA encoding human scaRNA U92 (Darzacq, Jady *et al.* 2002; Lestrade et Weber 2006) was amplified similarly with oligonucleotides hU92-F (5'-CCG GAA TTC TGG GAG GCT GAT ACA CAA ATT G-3') and hU92-R (5'-GCC TCT AGA ATC TGT CTG CCC CGT ATC TGT C-3') and cloned into *Eco*RI and *Xba*I restriction sites of pBluescript SK(-) to yield pBS-U92. The integrity of all constructs was verified by automated sequencing at the McGill University and Génome Québec Innovation Centre. The plasmid encoding human U3 snoRNA has been described previously (Baserga, Yang et Steitz 1991).

#### 2.4.2 In vitro RNA synthesis

All plasmids used for in vitro transcription of  $^{32}$ P-labeled RNAs were first linearized with the appropriate enzyme (*Eco*RI for U17 and hTR constructs, *Hind*III for ACA36, *Xba*I for U92, and *Rsa*I for U3). Radiolabeled RNAs were synthesized with T7 RNA polymerase (Ambion) essentially as described (Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000), and purified on 8% denaturing polyacrylamide gels.

#### 2.4.3 In vitro protein synthesis

Proteins were synthesized with the TNT T7-Quick coupled Transcription/Translation System (Promega). Individual or mixed templates were incubated with 20  $\mu$ l of rabbit reticulocyte lysate and 11  $\mu$ Ci of [ $^{35}$ S]-EXPRESS $^{35}$ S Protein Labeling Mix (PerkinElmer) in a final volume of 25  $\mu$ l for 90 minutes at 30°C. The TNT mixtures were then clarified by centrifugation at 14,000 $\times$ g for 10 minutes at room temperature; a 1- $\mu$ l aliquot was retrieved for protein analysis by PAGE before proceeding with IPs or RNP assembly (see below).

#### 2.4.4 RNP assembly

Clarified TNT mixtures (24  $\mu$ l) were incubated with 100,000 cpm of radiolabeled RNAs for 30 minutes at 30°C, and centrifuged for 10 min at 14,000 $\times$ g before proceeding with IPs.

#### 2.4.5 Immunoprecipitations

Mixtures were diluted 20 times in IP buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.9), 150 mM NaCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % NP-40 and Complete EDTA-free protease inhibitor cocktail (Roche), and incubated on a nutator at room temperature for 1 hour with 25  $\mu$ l of protein A-agarose beads (Roche) previously saturated with antibodies raised against human dyskerin (H-300, Santa Cruz Biotechnology) or human NAF1 (Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006). The beads were then washed 5 times with 1ml of IP buffer, and elution was achieved by heating the beads 3 minutes at 90°C in 25 $\mu$ l of XT sample buffer containing reducing agent (Bio-Rad). Eluates and the 1- $\mu$ l aliquots of TNT reactions (see In vitro protein synthesis) were fractionated on 4-12% gradient Criterion XT Bis-Tris gels (Bio-Rad). Gels were fixed in a 50% methanol, 10% acetic acid and 10% glycerol solution, dried on Whatman chromatography paper, exposed to a phosphor screen and revealed with a Molecular Imager FX (Bio-Rad). In order to visualize only the  $^{32}$ P-labeled RNA signal from the Criterion gels, a transparency was used to block the  $^{35}$ S-methionine signal that emanates from the proteins in the gels (Wang et Meier 2004). To check for possible RNA degradation, supernatant of IPs were extracted with phenol-chloroform and analyzed on 8% denaturing polyacrylamide gels.

To evaluate RNA processing in RRL, radiolabeled hTR204 from a NAF1 IP (carried out in the presence of NAF1, dyskerin, NOP10 and NHP2) and the IP supernatant were extracted with phenol-chloroform, precipitated in ethanol, and fractionated a 8% polyacrylamide sequencing gel together with the input RNA alone. For DNA size marker, MspI-digested pBR322 was terminally labeled with the Klenow fragment of DNA polymerase I (NEB).

## 2.5 Acknowledgments

We are indebted to Yves Henry, Patrick Matthias and Vanda Pogacic for gift of materials, and Chantal Autexier for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from the Banting Foundation, the Fonds de la recherche en santé du Québec (FRSQ), the Canadian Institutes for Health Research, and a Chercheur-boursier award of the FRSQ to FD.

## 2.6 Figure legends

**Figure 2.1:** Schematic secondary structure of the H/ACA domain of hTR. Residues are numbered according to full-length hTR. Conserved motifs H and ACA are boxed. Sequence changes made in this study are indicated; they correspond to mutations in conserved box H (A372U), box ACA (A446G), and the CAB box highlighted by a dashed line (G414C and inv413-416), as well as disease-related mutations C408G, G450A and  $\Delta$ 378-451 deletion. CR7 is enlarged to better show its normal structure, which is altered in the DC mutant C408G.

**Figure 2.2:** The tetramer NAF1-dyskerin-NOP10-NHP2 assembles specifically with hTR204. (A) Individual proteins were translated in vitro in the presence of  $^{35}\text{S}$ -labeled methionine and analyzed by PAGE (left panel). For dyskerin IPs (right panel),  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins were co-translated; the presence or absence of each protein in the RRL mixture is indicated by (+) or (–), respectively. Input of translated proteins (in) and immunoprecipitated products (IP) were separated by PAGE. Molecular weight markers (in kDa) are shown between the two panels. Control IP with beads alone is shown (lanes 22-23). Note that dyskerin recovered from IPs gives a fuzzy signal. High molecular weight multimers of H/ACA proteins are also observed. (B) Dyskerin IPs (left) and NAF1 IPs (right) of RRL mixtures containing  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins and  $^{32}\text{P}$ -labeled hTR204 (lanes 1-5, 11-15) or U3 (lanes 6-10, 16-20) RNAs were analyzed by PAGE. Because RNAs co-migrate with dyskerin in these protein gels, input lanes (in) did not contain the  $^{32}\text{P}$ -labeled RNAs to better discern the  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins. IPs with RRL mixtures lacking either dyskerin (-dysk) or NAF1 (-NAF1) were used as negative controls. Labeled hTR204 (lanes 1 and 11) and U3 (lanes 6 and 16) RNAs not incubated in RRL are shown. Bands marked by an asterisk (\*) correspond to degradation products of dyskerin/NAF1, not to fibrillarin, which was omitted from NAF1 IPs (right). The bottom panels show the  $^{32}\text{P}$  signal from the protein gels presented in top panels; they were obtained by blocking the  $^{35}\text{S}$  signal with a transparency. (C) Labeled RNAs from input (lanes 1, 6, 11, 16) and IP supernatants (lanes 3, 5, 8, 10, 13, 15, 18, 20) were analyzed separately on 8% denaturing polyacrylamide gels. Lanes are numbered in accordance with the corresponding IPs shown in B.

**Figure 2.3:** Binding of NAF1 to hTR204 requires the trimer dyskerin/NOP10/NHP2. (*A*, *C*) RRL mixtures containing  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins and  $^{32}\text{P}$ -labeled hTR204 were subjected to dyskerin IP (*A*) or NAF1 IP (*C*) and analyzed by PAGE (top panels). The presence or absence of each protein in the RRL mixtures is indicated by (+) or (–), respectively. Input lanes (in) did not contain the  $^{32}\text{P}$ -labeled hTR204. Note that the left and right panels in *C* come from the same gel exposition. Bottom panels show only the  $^{32}\text{P}$  signal of the protein gel (see legend to Figure 2B for details). (*B*, *D*) Labeled hTR204 recovered from supernatants of dyskerin or NAF1 IPs (see *A* and *C*, respectively) were analyzed on 8% denaturing polyacrylamide gels. Lanes are numbered in accordance with the corresponding dyskerin and NAF1 IPs shown in *A* and *C*, respectively. (*E*) RRL mixtures containing  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins and  $^{32}\text{P}$ -labeled ACA36, U92 or U17 were subjected to NAF1 IP and analyzed by PAGE (top panels). The presence or absence of each protein in the RRL mixtures is indicated by (+) or (–), respectively. Input lanes (in) did not contain the radiolabeled RNAs. Labeled ACA36 (lane 1), U92 (lane 8) and U17 (lane 15) RNAs not incubated in RRL are shown. Bottom panels show only the  $^{32}\text{P}$  signal of the protein gels presented in top panels. (*F*) Labeled ACA36, U92 or U17 recovered from supernatants of NAF1 IPs shown in *E* were analyzed on 8% denaturing polyacrylamide gels. Lanes are numbered in accordance with the corresponding IPs shown in (*E*).

**Figure 2.4:** Some mutations in hTR204 impair pre-RNP assembly. (*A*) PAGE analysis of NAF1 IPs conducted on RRL mixtures containing  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins and  $^{32}\text{P}$ -labeled hTR204 or its derivatives bearing mutations in conserved motifs (see text for details). Input lanes (in) did not contain the  $^{32}\text{P}$ -labeled RNAs. The bottom panel shows only the  $^{32}\text{P}$  signal of the protein gel (see legend to Figure 2B for details). (*B*) NAF1 IPs conducted and analyzed as in *A* with  $^{32}\text{P}$ -labeled hTR204 or its derivatives bearing disease-related mutations C408G, G450A and  $\Delta 378$ -451. The double mutant C408G-G412C restores base pairing (see text for details). (*C*)  $^{32}\text{P}$ -labeled hTR204 (arrow) recovered from a NAF1 IP (lane 3) and the IP supernatant (lane 2) was analyzed on an 8% sequencing gel. Untreated  $^{32}\text{P}$ -labeled hTR204 (in) was run in parallel (lane 1). Sizes of  $^{32}\text{P}$ -labeled DNA markers (lane 4) are indicated in nt on the right.

2.7 Figures

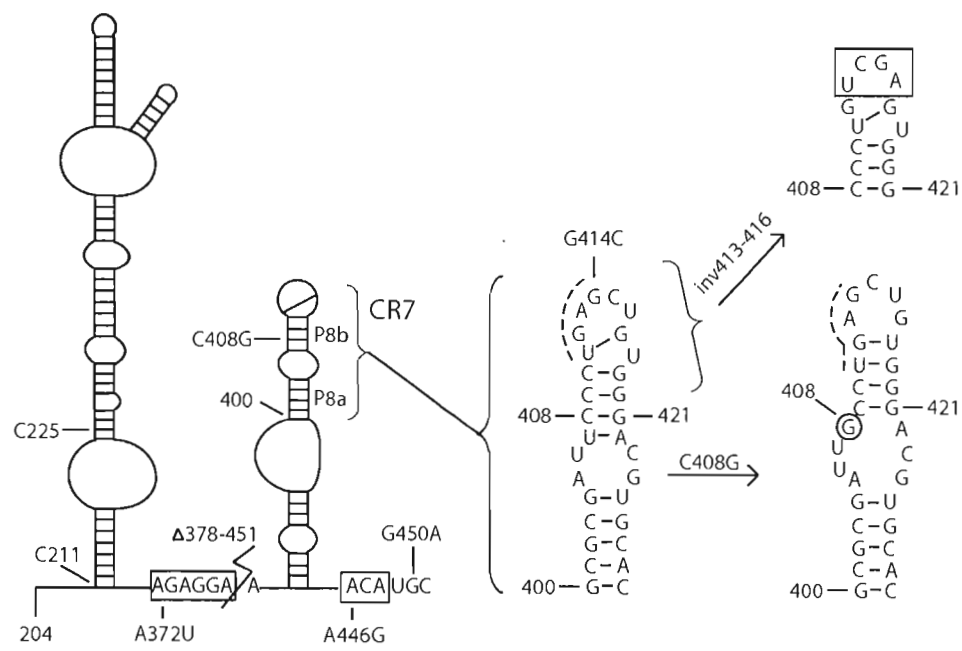


Figure 2.1

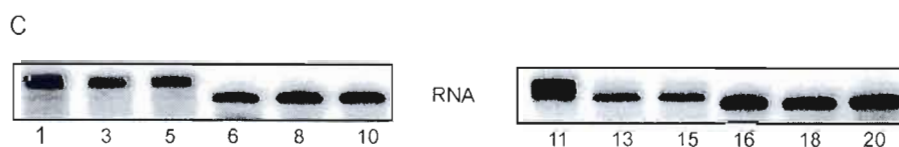
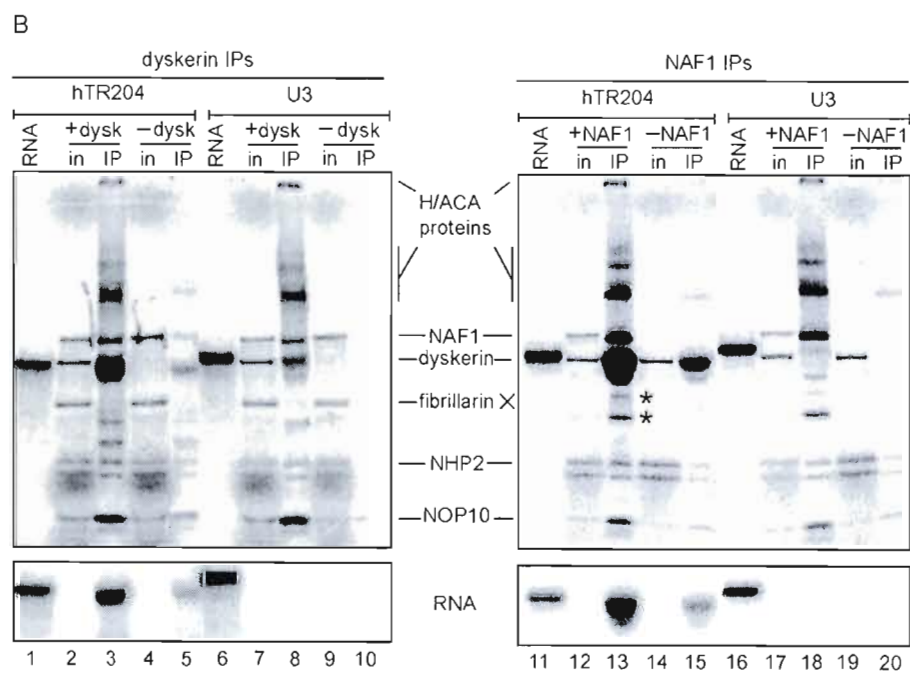
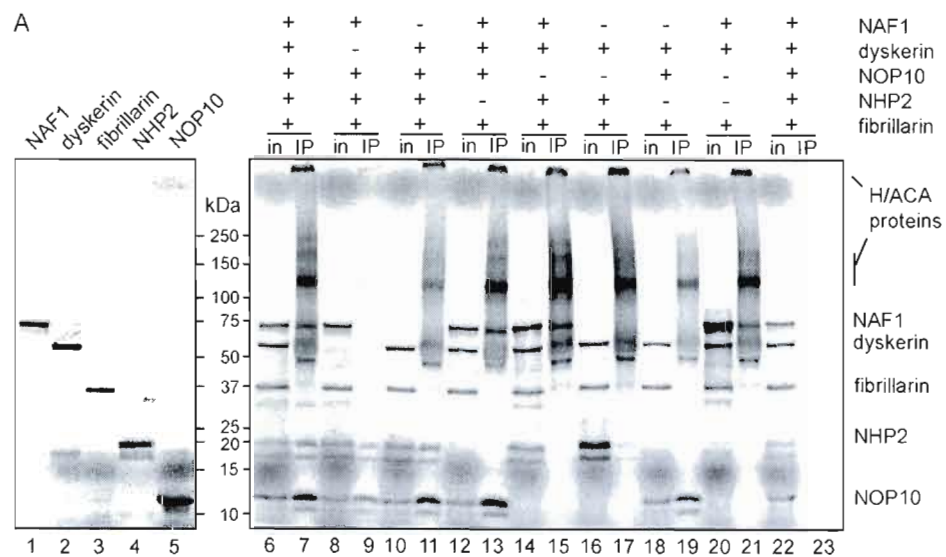


Figure 2.2



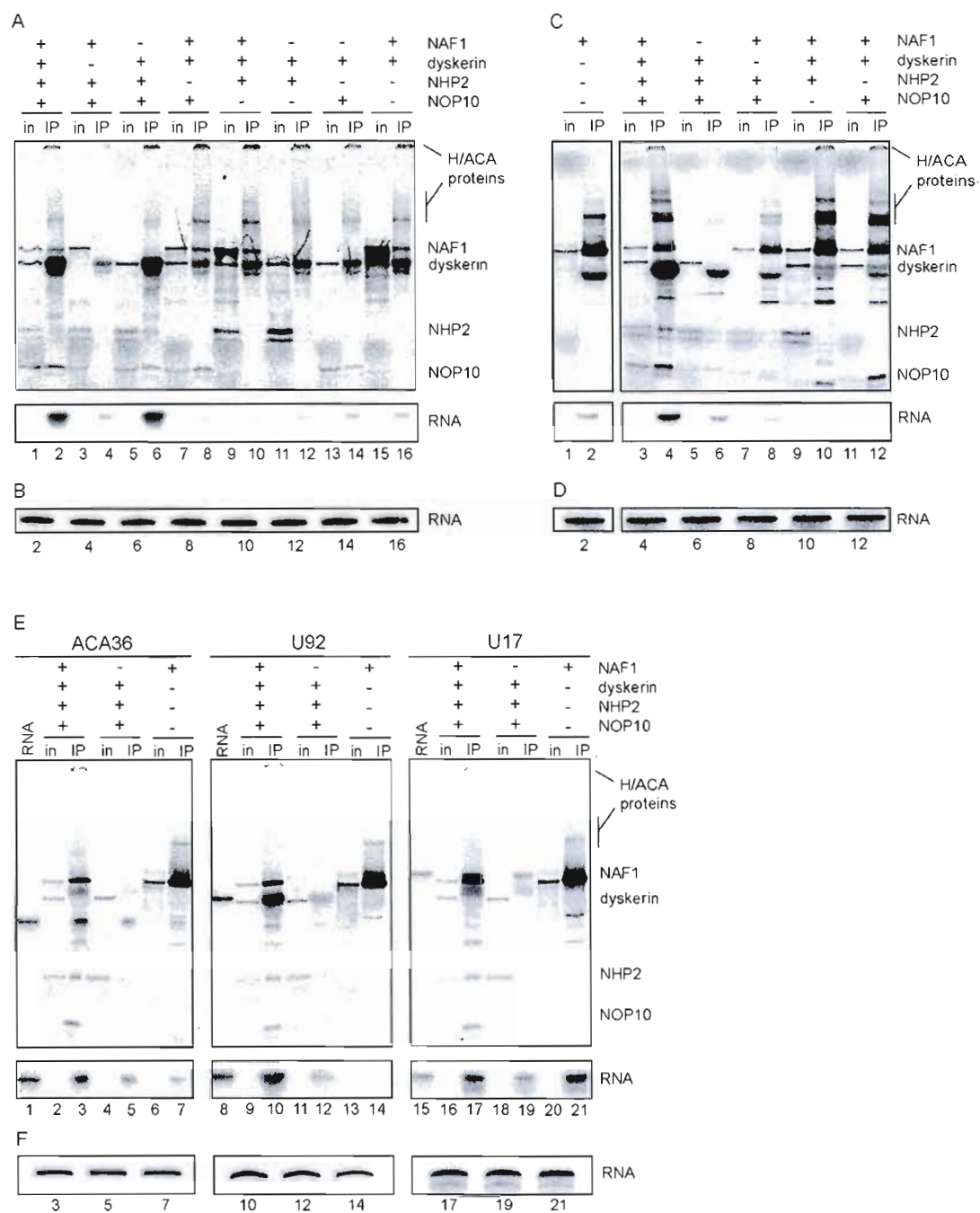


Figure 2.3

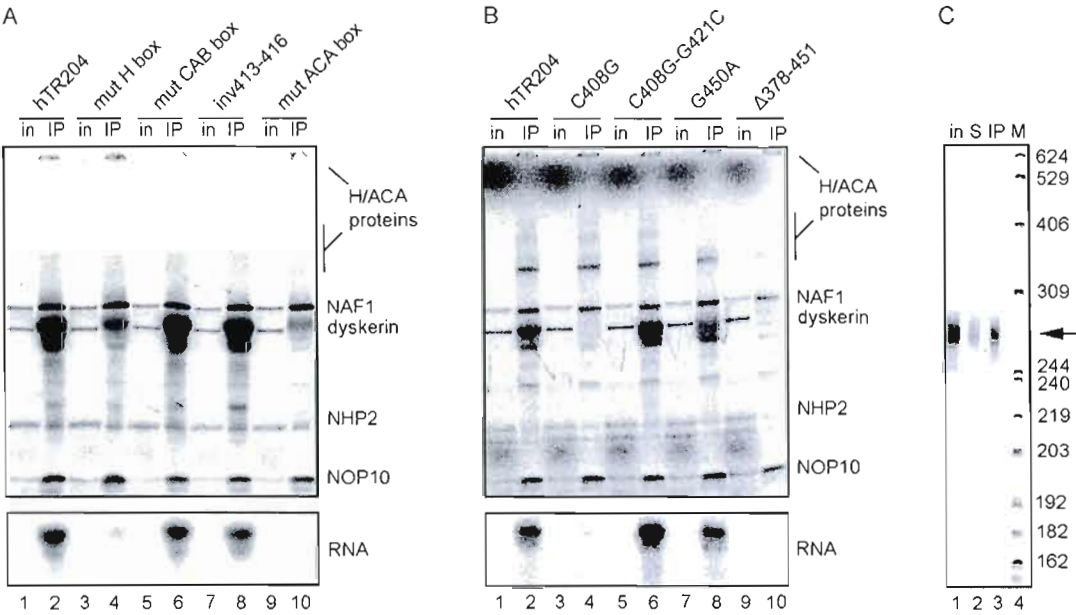


Figure 2.4

## CHAPITRE III

### ANALYSE DE L'EFFET DES MUTATIONS ASSOCIÉES À LA DC DANS LES PROTÉINES DYSKÉRINE, NHP2 ET NOP10 SUR L'ASSEMBLAGE DE PRÉ-RNP H/ACA

#### AVANT PROPOS

Le système *in vitro* de reconstitution de pré-RNP H/ACA ayant été mis au point, j'ai par la suite pu l'utiliser afin d'analyser l'effet de mutations reliées à la DC dans les protéines dyskérine, NOP10 et NHP2, sur l'assemblage de pré-RNP avec différentes classes d'ARN H/ACA, incluant le domaine H/ACA de hTR.

#### Contributions :

Caroline Martel a réalisé le clonage de quelques mutants de la dyskérine et de scaRNA utilisés lors de cette étude. J'ai effectué les expériences et interprété les résultats moi-même sous la supervision du Dr François Dragon. J'ai également contribué à la majeure partie de la rédaction de l'article avec l'aide du Dr François Dragon.

## **Effects of dyskeratosis congenita mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on assembly of H/ACA pre-RNPs**

Christian Trahan<sup>1</sup>, Caroline Martel<sup>1,2</sup> and François Dragon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Département des sciences biologiques and Centre de recherche BioMed, Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

<sup>2</sup> Present address : Department of Microbiology and Immunology, McGill University, Montréal, Québec, H3A 2B4, Canada

\*Correspondence: [dragon.francois@uqam.ca](mailto:dragon.francois@uqam.ca)

Office: 1-514-987-3000 ext. 2063

Fax: 1-514-987-4647

### 3.1 Abstract

Dyskeratosis congenita (DC) is a rare genetic syndrome that gives rise to a variety of disorders in affected individuals. Remarkably, all causative gene mutations identified to date share a link to telomere/telomerase biology. We found that the most prevalent dyskerin mutation in DC (A353V) did not affect formation of the NAF1-dyskerin-NOP10-NHP2 tetramer that normally assembles with nascent H/ACA RNAs *in vivo*. However, the A353V mutation slightly reduced pre-RNP assembly with the H/ACA-like domain of human telomerase RNA (hTR). In contrast, NHP2 mutations V126M and Y139H impaired association with NOP10, leading to major pre-RNP assembly defects with all H/ACA RNAs tested, including the H/ACA domain of hTR. Mutation R34W in NOP10 caused no apparent defect in protein tetramer formation, but it severely affected pre-RNP assembly with the H/ACA domain of hTR and a subset of H/ACA RNAs. Surprisingly, H/ACA sno/ scaRNAs that encode miRNAs were not affected by the mutation R34W, and they were able to form pre-RNPs with NOP10-R34W. This indicates structural differences between H/ACA RNPs that encode miRNAs and those that do not. Altogether, our results suggest that, in addition to major defects in the telomere/telomerase pathways, some of the disorders occurring in DC may be caused by alteration of most H/ACA RNPs, or by only a subset of them.

### 3.2 Introduction

Dyskeratosis congenita (DC) is a genetic disease that leads to a wide spectrum of disorders. Bone marrow failure accounts for the majority of fatalities of affected individuals. To date, mutations in six genes have been linked to about half of DC cases indexed in the Dyskeratosis Congenita Registry (London, UK). However, the genetic abnormalities of the remaining cases have not been identified. All six genes share a common feature: they all have a function in the telomere/telomerase pathways and are considered to be responsible for telomere erosion or inefficient telomere elongation/maintenance by telomerase, leading to bone marrow failure (Garcia, Wright et Shay 2007; Kirwan et Dokal 2009; Vulliamy et Dokal 2008; Walne et Dokal 2009).

One of the six genes linked to DC encodes TIN2, a protein of the shelterin complex that regulates and protects telomeres at the ends of eukaryotic chromosomes (Palm et de Lange 2008; Savage, Giri *et al.* 2008; Walne, Vulliamy *et al.* 2008). Two other genes encode essential components of telomerase; the reverse transcriptase enzyme (hTERT), and the RNA component of telomerase (hTR) that contains the template for the addition of TTAGGG telomeric repeats by hTERT (Collins 2008). While the 5' half of hTR adopts a conserved pseudoknot structure that harbors the telomeric template in all eukaryotes, its 3' half folds into a hairpin-hinge-hairpin-tail structure that is similar to that of H/ACA small nucleolar (sno) RNAs and small Cajal body-specific (sca) RNAs, and this region has been coined the H/ACA-like domain (Antal, Boros *et al.* 2002; Chen, Blasco et Greider 2000; Chen et Greider 2004; Mitchell, Cheng et Collins 1999; Theimer et Feigon 2006). H/ACA snoRNAs and scaRNAs mainly serve as guides for the pseudouridylation of rRNAs and snRNAs, respectively (Kiss, Fayet *et al.* 2006; Matera, Terns et Terns 2007; Reichow, Hamma *et al.* 2007). They adopt a common fold that consists of a hairpin followed by a single-stranded hinge containing box H [consensus sequence ANANNA, where N is any nucleotide (nt)], another hairpin, and a single-stranded tail with the ACA box located three nt from the 3' end (Balakin, Smith et Fournier 1996; Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss 1997). Although no pseudouridylation target has been found for the H/ACA domain of hTR, this domain is essential for telomerase stability and accumulation *in vivo* (Collins 2008). The last three

genes implicated in DC encode the pseudouridine synthase dyskerin (Heiss, Knight *et al.* 1998), NOP10 (Walne, Vulliamy *et al.* 2007) and NHP2 (Vulliamy, Beswick *et al.* 2008), which form a trimer that assembles with H/ACA sno/scaRNAs and the 3' domain of hTR (Dez, Henras *et al.* 2001; Fu et Collins 2007; Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000; Trahan et Dragon 2009; Wang et Meier 2004). While the transmission mode of DC is autosomal dominant for TIN2, hTR and most hTERT mutations, the X-linked form of the disease caused by mutations in dyskerin as well as autosomal mutations in NOP10 and NHP2 are recessively transmitted (Walne et Dokal 2009).

There is evidence that, together with the nuclear assembly factor 1 protein (NAF1), the dyskerin-NOP10-NHP2 trimer packages nascent H/ACA RNAs at their transcription site to form inactive precursor RNPs (pre-RNPs). All four pre-RNP protein components are essential for the accumulation of H/ACA RNAs, including hTR. The presence of NAF1 in the pre-RNPs is transient. Indeed, GAR1 is substituted for NAF1 by an unknown mechanism to produce mature, active H/ACA RNPs, which localize in Cajal bodies and nucleoli (Ballarino, Morlando *et al.* 2005; Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Dez, Henras *et al.* 2001; Dez, Noaillac-Depeyre *et al.* 2002; Fatica, Dlakic et Tollervey 2002; Fu et Collins 2007; Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006; Yang, Hoareau *et al.* 2005; Yang, Rotondo *et al.* 2002). All DC patients harboring mutations in dyskerin, NOP10 or NHP2 have markedly reduced cellular levels of hTR, and short telomeres (Kirwan et Dokal 2009).

With the exception of NAF1, homologs of dyskerin (aCbf5), NOP10 (aNop10), NHP2 (L7Ae) and GAR1 (aGar1) are found in *Archaea*, where they assemble with small RNAs (sRNA) that are homologous to eukaryotic H/ACA RNAs. Archaeal sRNAs assemble directly into active pseudouridylating sRNPs, reflecting a simpler cellular organization. Most protein-protein interactions are conserved between homologous eukaryotic and archaeal proteins, although some adaptive changes have occurred in *Eukarya*. For instance, human dyskerin contains additional terminal extensions not found in aCbf5. In both domains of life, NOP10/aNop10 bridges dyskerin/aCbf5 and NHP2/L7Ae to form a trimer that provides a composite RNA-binding surface for RNP assembly. Although L7Ae alone binds specifically to the K-turn motif present in hairpin loops of sRNAs, NHP2 alone binds RNA non-

specifically and does not recognize K-turn motifs, which are not found in eukaryotic H/ACA RNAs (Matera, Terns et Terns 2007; Reichow, Hamma *et al.* 2007). However, NHP2 binding to H/ACA RNAs was shown to be specific within the rat dyskerin-NOP10-NHP2 trimer (Wang et Meier 2004) and the human NAF1-dyskerin-NOP10-NHP2 tetramer (Trahan et Dragon 2009). In addition, while aCbf5 directly binds to H/ACA RNAs *in vitro*, the protein trimer dyskerin-NOP10-NHP2 is the minimal RNA-binding surface required for *in vitro* assembly of mammalian H/ACA RNPs.

We recently showed that NAF1 requires the trimer dyskerin-NOP10-NHP2 in order to be efficiently assembled onto the H/ACA domain of hTR and other H/ACA RNAs *in vitro*. This system proved useful to assess the effects of DC mutations located in the H/ACA domain of hTR on pre-RNP assembly (Trahan et Dragon 2009). Here, we used the same system to investigate the effects of recessive DC-linked mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on the NAF1-dyskerin-NOP10-NHP2 interactions, and H/ACA pre-RNP assembly. We found that recessive DC mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 caused different defects in the assembly of H/ACA pre-RNPs.



### 3.3 Results

Our *in vitro* system consists of  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins produced in rabbit reticulocyte lysate (RRL) that are incubated with *in vitro* transcribed  $^{32}\text{P}$ -labeled H/ACA RNAs. Formation of the complexes (protein complexes or RNPs) was monitored by a series of immunoprecipitation experiments. We found that immunoprecipitation against NAF1 was the best way to analyze the assembly of pre-RNPs. Indeed, NAF1 is not present in mature H/ACA RNPs and it requires the protein trimer dyskerin-NOP10-NHP2 to be efficiently incorporated into pre-RNPs. This requirement apparently applies to most H/ACA RNAs, with the exception of the processing snoRNA U17, which does not require the dyskerin-NOP10-NHP2 trimer to associate with NAF1 (Trahan et Dragon 2009). We showed that protein-protein and RNA-protein interactions are specific in this system, therefore, protein and RNA negative controls were not included in this study.

#### 3.3.1 DC mutations in dyskerin do not markedly affect pre-RNP assembly

We first sought to analyze the assembly of the protein tetramer NAF1-dyskerin-NOP10-NHP2 in the presence of various dyskerin derivatives bearing mutations associated with DC: F36V (Heiss, Knight *et al.* 1998), R158W and S280R (Knight, Vulliamy *et al.* 2001), R322Q (Marrone et Mason 2003), A353V (Knight, Heiss *et al.* 1999), S420Y (Vulliamy, Marrone *et al.* 2006); A.B. Metzenberg, personal communication), as well as a  $\Delta 22\text{C}$  mutant lacking 22 amino acids at the C-terminus (Knight, Vulliamy *et al.* 1998). IPs against NAF1 were carried out on protein tetramers co-translated in RRL. To monitor the low level background signals mediated by endogenous H/ACA proteins present in RRL (Trahan et Dragon 2009), we used RRL translation mixtures in which the IP target was omitted. None of the tested dyskerin mutations affected tetramer formation (Figure 1). Note that the fuzzy migration of immunoprecipitated dyskerin was not observed with the  $\Delta 22\text{C}$  mutant, indicating that the deleted region is involved in this aberrant migration. The C-terminal end of dyskerin contains 9 lysine residues out of 22 amino acids (DSDTTKKKKKKKKAKEVELVSE). This high number of positive charges might not be sufficiently neutralized by the XT loading buffer that is used with Criterion XT Bis-Tris gels, and which does not contain SDS. In line with

this assumption, input lanes did not show aberrant migration, probably because only a tiny fraction of the RRL mixture was diluted in XT loading buffer before electrophoresis (see Materials and Methods).

To determine if mutations in dyskerin could impair H/ACA pre-RNP formation, we analyzed their assembly with various  $^{32}\text{P}$ -labeled RNAs incubated with the tetramer-programmed RRL before proceeding with NAF1 IPs. We first tested pre-RNP assembly with a telomerase RNA fragment that we named hTR204. This fragment extends from residue 204 to the 3' end (residue 451) of hTR, and encompasses the H/ACA-like domain of hTR. This domain folds into a hairpin-hinge-hairpin-tail structure that is characteristic of H/ACA sno/scaRNAs, and it contains the features that are essential to bind H/ACA proteins (Antal, Boros *et al.* 2002; Chen, Blasco et Greider 2000; Chen et Greider 2004; Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000; Fu et Collins 2003; Jady, Bertrand et Kiss 2004; Lukowiak, Narayanan *et al.* 2001; Mitchell, Cheng et Collins 1999; Theimer et Feigon 2006). Although it remains possible that portions of the pseudoknot domain of hTR could interact with H/ACA proteins, these regions would certainly play a very minor role in assembly of the H/ACA-like domain with H/ACA proteins. Indeed, competition experiments showed that deletion of the 5' half of hTR had no effect on the assembly of an H/ACA snoRNP, whereas a deletion of only 23 nucleotides at the 3'-end of hTR abolished competition (Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000). Other sno/scaRNAs were also assayed for assembly with dyskerin mutants. These experiments showed no severe impairment of pre-RNP assembly with any of the RNAs tested (Figure 2). We observed repeatedly that mutant A353V caused a mild impairment of the assembly of hTR204 pre-RNP (Figure 2A) but did not affected the other H/ACA RNAs tested (Figure 2B). Because NAF1 binds to U17 snoRNA independently of the protein trimer dyskerin-NOP10-NHP2, we could not carry out NAF1 IPs to assess the assembly of U17 with the tetramer. To circumvent this problem, reconstitutions were done in the absence of NAF1 and we carried out IPs against HA-tagged NOP10, looking at RNPs assembled with the protein trimer dyskerin-NOP10-NHP2. This trimer is the minimal protein complex required to associate specifically with H/ACA RNAs (Trahan et Dragon 2009; Wang et Meier 2004). In this situation, we did not observe any obvious defects in U17 pre-RNP assembly with the dyskerin mutants tested (Figure 2B). Labeled RNAs from the IP

supernatants were analyzed separately on denaturing polyacrylamide gels, and no degradation or difference in inputs was noted (data not shown).

### 3.3.2 DC-linked NHP2 mutations impair protein tetramer formation

Three DC mutations have been identified in NHP2: V126M, Y139H and X154R. Mutation X154R changes the termination codon into an arginine codon, and extends the open reading frame to produce a mutant NHP2 protein with a 51 amino acid extension at its C-terminus (Vulliamy, Beswick *et al.* 2008). To investigate the possible assembly defects caused by these mutations, we first analyzed whether formation of the protein tetramer was affected. Wild-type NHP2 or its mutant derivatives were produced in RRL together with NOP10, dyskerin and NAF1, and NAF1 IPs were carried out. As seen in Figure 3A, mutants V126M and Y139H were not incorporated in the protein tetramer (compare the NHP2 signal in lanes 6 and 8 with that of lane 2). These results indicated that mutations V126M and Y139H impaired NHP2 binding to NOP10, which is essential for tetramer formation and subsequent RNP assembly (Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Trahan et Dragon 2009). In line with these findings, pre-RNP formation with hTR204 and other sno/scaRNAs was impaired in the programmed RRL mixtures (see Figures 3B and 3C), indicating that addition of H/ACA RNAs to the RRL mixtures did not stimulate protein tetramer or RNP assembly. Labeled RNAs from the IP supernatants were analyzed separately on denaturing polyacrylamide gels, and no degradation or difference in inputs was observed (data not shown). It is worth noting that the effect of mutation V126M was less severe than that of mutation Y139H, even though protein expression levels were identical in both RRL mixtures (compare lanes 5 and 7). In marked contrast with V126M and Y139H mutants, the extension of the C-terminus (X154R) had no apparent effect on tetramer formation (Figure 3A, lane 10) or pre-RNP formation (see lane 10 in Figures 3B and 3C).

### 3.3.3 Mutation R34W in NOP10 does not impair pre-RNP assembly of miRNA-encoding sno/scaRNAs

We analyzed protein tetramer formation and pre-RNP assembly with NOP10 bearing mutation R34W, the only causal mutation of DC that has been identified in NOP10 (Walne, Vulliamy *et al.* 2007). Protein tetramers were reconstituted in RRL using either wild-type NOP10 or its mutant derivative R34W, and we conducted NAF1 IPs to analyze protein-protein interactions. No defect in protein tetramer formation could be detected in our assays (Figure 4A). However, when the co-translated tetramers were incubated with  $^{32}$ P-labeled hTR204 RNA, only background levels of hTR204 could be immunoprecipitated with the tetramer containing mutated NOP10 (Figure 4B), indicating that the R34W mutation causes a major defect in hTR204 pre-RNP assembly. Pre-RNP assembly with snoRNAs U17 and U64, and with the scaRNA U93 was also impaired by the NOP10 mutation R34W (Figure 4C). We noted that pre-RNP assembly of E2 snoRNA with wild-type proteins was extremely inefficient compared to other sno/scaRNAs tested (see Figure 4C lane 2, and (Trahan et Dragon 2009)). In the case of E2, gels had to be over-exposed to detect co-immunoprecipitated E2 snoRNA, suggesting that E2 might be assembled in an atypical manner and could require additional factor(s) that are scarce in RRL. In any case, we did observe an impairment of E2 pre-RNP assembly caused by the NOP10 mutation R34W (compare lanes 4 and 6 in Figure 4D). Surprisingly, pre-RNP assembly with scaRNA U92 and snoRNA ACA36B was unaffected by the R34W mutation (Figure 4C). These two RNAs belong to a class of miRNA-encoding H/ACA RNAs (Ender, Krek *et al.* 2008). Taken together, our results suggest that miRNA-encoding H/ACA RNAs assemble differently from “classical” H/ACA sno/scaRNAs.

### 3.3.4 In silico modeling of 3D structures

To gain insight into the effect of DC mutations in NHP2 and NOP10 on the overall structure of the proteins, we carried out *in silico* 3D structure predictions using I-TASSER without specifying any template (Wu, Skolnick et Zhang 2007; Zhang 2007; Zhang 2008). Confidence scores (C-scores) ranged from minus 5 to plus 2: higher scores are attributed to

models with higher confidence. The best prediction for wild-type NHP2 (C-score of -1,14) could be well superimposed on the structure of the homologous L7Ae (Figure 5A) observed in the crystal structure of *Pyrococcus furiosus* sRNP (Li et Ye 2006). According to 3D structure predictions, neither the V126M mutation (C-score of -0,99) nor the Y139H mutation (C-score of -0,92) appeared to induce evident structural changes within the protein, as shown in Figures 5B and 5C, respectively.

To do the 3D structural predictions of wild-type NOP10 and the R34W mutant, certain observations were taken into consideration. It has been shown that the archaeal and yeast Nop10 become structured upon aCbf5 binding (Hamma, Reichow *et al.* 2005). Moreover, the minimal eukaryotic protein complex able to bind H/ACA RNAs is the dyskerin-NOP10-NHP2 trimer. Therefore, in order to account for the steric interactions with other components of the RNP, we used the aNop10 structure of the sRNP (Li et Ye 2006) as template for the modeling of human NOP10. Apart from the N-terminus that adopts a zinc ribbon in aNop10 compared to a beta-hairpin in eukaryotic NOP10, the rest of the protein is highly flexible. We know that aNop10 interacts with aCbf5 throughout its whole length and that this interface is highly conserved in eukaryotes. Thus, upon binding to dyskerin, NOP10 should adopt a conformation highly similar to that observed for aNop10 in the sRNP crystal, positioning residue R34 in a similar conformation in eukaryotic H/ACA RNPs. The best predicted structures of wild-type NOP10 (C-score of 0,01) and NOP10-R34W (C-score of 0,11) are shown superimposed on the structure of aNop10 from the sRNP (Figure 5D and 5E). Based on NOP10 structure predictions, the R34W mutation would only affect the residue at position 34 without perturbing the position of surrounding residues interacting with the RNA, aCbf5 or L7Ae.

### 3.4 Discussion

The dynamic co-transcriptional assembly of H/ACA pre-RNPs in living cells is a well-orchestrated and efficient process (Darzacq, Kittur *et al.* 2006). Because pre-RNPs exist only transiently *in vivo*, our *in vitro* system was extremely useful to assess pre-RNP assembly in the context of DC mutations (Trahan et Dragon 2009; and this study). Assembly of H/ACA pre-RNPs is probably much more efficient *in vivo*, and we cannot exclude the possibility that, apart from the NAF1-dyskerin-NOP10-NHP2 tetramer, other factors may be required for effective H/ACA pre-RNP formation in living cells. Nevertheless, H/ACA pre-RNPs can be formed in our system, and the assembly is very specific (Trahan et Dragon 2009). This suggests that, if other factors are required, the RRL provides sufficient amounts of endogenous proteins to support constant pre-RNP assembly. It is important to stress that mutations that do perturb assembly of H/ACA RNPs can readily be detected with our *in vitro* system, whereas mutations having more subtle effects, or that become deleterious in downstream events, cannot.

#### 3.4.1 DC mutations in dyskerin

One of the striking findings of our *in vitro* study is that none of the dyskerin mutations appeared to affect the formation of the protein tetramer NAF1-dyskerin-NOP10-NHP2 or pre-RNP formation. Because the PUA domain of archaeal aCbf5 and yeast Cbf5p interacts with the ACA box and the 3'-end of H/ACA RNAs, it has been suggested that DC mutations in the PUA domain could weaken its interaction with H/ACA RNAs (Baker, Seyfried *et al.* 2008; Li et Ye 2006; Mochizuki, He *et al.* 2004; Normand, Capeyrou *et al.* 2006). Surprisingly, the mutation R322Q in the PUA domain had no apparent effect on pre-RNP assembly, while the most prevalent mutation A353V had a reproducible mild effect on pre-RNP assembly with the telomerase RNA fragment hTR204. In line with our results, a study with murine embryonic stem (ES) cells showed that the A353V mutation caused a severe decrease in the level of mouse telomerase RNA (mTR). Moreover, this mutation affected the levels of some but not all H/ACA snoRNAs, but none were decreased to the same extent as

mTR (Mochizuki, He *et al.* 2004). Our results further show that telomerase pre-RNP assembly is more sensitive than other H/ACA pre-RNPs to the A353V mutation. The difference between the mild effect on hTR204 pre-RNP assembly and the severe reduction of mTR level in mouse ES cells may be explained by the decreased mRNA and protein levels of Dck1-A353V in those cells (Mochizuki, He *et al.* 2004). Indeed, such low levels might not be sufficient to maintain robust assembly of H/ACA RNPs. It is also possible that subtle defects in RNA-protein interactions can be tolerated in our simplified *in vitro* system, producing complete but incorrectly assembled pre-RNPs. Such defects could have more serious consequences *in vivo*.

#### 3.4.2 DC mutations in NHP2

3D structure predictions made with I-TASSER did not show any major changes in the overall structure for both V126M and Y139H mutants (Figure 5B and 5C). It appears that residues V126 and Y139 are involved in core packing and both residues are well conserved, indicating an important structural or stabilizing role in the protein. Residue V126 is positioned right above two alpha-helices that bind Nop10 (Figure 5A); it is possible that the V126M mutation could interfere with the packing of these helices and destabilize the interaction with NOP10. A valine residue occupies this position in vertebrates, and is replaced by other hydrophobic residues in other eukaryotes, whereas a small polar residue (serine) is conserved in *Archaea* (Figure 6). Y139 is also a core-packing residue, and it is conserved as a hydrophobic residue in all species. This residue has no obvious connection to Nop10 binding sites (Figure 5A). However, since it is involved in core packing, replacement with a positively charged histidine residue could interfere with the core packing/stability of NHP2 and consequently, this could affect NOP10 binding. We cannot exclude the possibility that the Y139H mutation could interfere with a chaperone needed to mediate the NHP2-NOP10 interaction.

Only two DC patients with NHP2 mutations have been identified to date. One individual is a NHP2-Y139H homozygote (family DCR096) and the second individual is a NHP2-V126M/X154R compound heterozygote (family DCR177) (Vulliamy, Beswick *et al.* 2008).

We showed that NHP2 binding to NOP10 is severely impaired by the Y139H mutation, and that no pre-RNP could be generated with hTR204. Since the binding of NHP2 to NOP10-dyskerin-NAF1 is a prerequisite for pre-RNP assembly (Trahan et Dragon 2009), and that all four proteins are essential for hTR accumulation *in vivo* (Dez, Henras *et al.* 2001; Fu et Collins 2007; Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006), impairment of pre-telomerase RNP assembly would likely trigger the degradation of hTR *in vivo*, leading to critically short telomeres (Vulliamy, Beswick *et al.* 2008). Furthermore, our results suggest that impairment of pre-RNP assembly may be generalized to most H/ACA RNAs in the DC NHP2-Y139H homozygote individual. Radical abrogation of pre-RNP assembly with all H/ACA RNAs may account for the greater variety of disorders presented by this individual compared to the DC V126M/X154R heterozygote individual.

It was suggested that extending the C-terminus of NHP2 (mutant X154R) would interfere with its ability to bind the other H/ACA proteins or to form RNPs (Vulliamy, Beswick *et al.* 2008). However, there was no observable defect in protein complex or pre-RNP formation for this mutant in our assays. Since DC mutations in NHP2 are recessively transmitted, the defect caused by the extended C-terminus of NHP2 must therefore lie downstream in the biogenesis pathways of hTR and other H/ACA RNAs. On the other hand, the V126M mutation in NHP2 impaired its association with NOP10 and the formation of H/ACA pre-RNPs, but the effect was not as strong as that observed with the Y139H mutation. While the effect of NHP2-V126M could account for the reduction of pre-telomerase RNP levels in the compound heterozygote individual (Vulliamy, Beswick *et al.* 2008), our results imply that pre-RNPs are formed with the X154R mutant and that they may accumulate to a certain extent *in vivo*, possibly giving rise to fewer disorders than those seen in the NHP2-Y139H homozygote (Vulliamy, Beswick *et al.* 2008).

### 3.4.3 DC mutation R34W in NOP10

The arginine residue at position 34 of NOP10 is conserved from archaeobacteria to humans (Figure 6B), although a lysine is sometimes found at this position in *Archaea* (Hamma, Reichow *et al.* 2005; Li et Ye 2006; Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000; Rashid,



Liang *et al.* 2006; Reichow *et al.* Varani 2008). In the crystal structure of *P. furiosus* H/ACA sRNP, aNop10 residues R34, S36 and E38 interact with a single H/ACA hairpin derived from Afu46 (Li *et al.* Ye 2006). R34 inserts into the major groove of the RNA helix above the pseudouridylation pocket, and forms hydrogen bonds with phosphates linking C18 to C19 and U32 to G33 (see Figure 5D). Interestingly, the terminal loop of archaeal Afu46 stem-loop bears an unpaired uridine (U32) that is part of the K-turn motif recognized by L7Ae (Li *et al.* Ye 2006; Rozhdestvensky, Tang *et al.* 2003). This bulging U makes direct contacts with L7Ae, while aNop10 interacts with its phosphate (Hamma *et al.* Ferre-D'Amare 2004; Li *et al.* Ye 2006). Unpaired uridines were found in similar positions in the terminal loop of human U64 (U103) and hTR (U418), and they could be a reminiscent feature of the K-turn motif (Theimer, Jady *et al.* 2007).

We showed that the R34W mutation caused no apparent defect in formation of the protein tetramer, and that this RNA-interacting residue is crucial for pre-RNP assembly with hTR and other classical H/ACA sno/scaRNAs (Figure 4). Moreover, *in silico* modeling predicts that the R34 residue of eukaryotic Nop10 adopts the same conformation as that observed in the archaeal sRNP (Figure 5D). Taken together, these results suggest that loss of RNA-binding by the R34W mutation is due to the loss of cation interactions with classical H/ACA RNAs; the R34W mutation could prevent proper alignment of the RNA on the composite RNA-binding surface of dyskerin-NOP10-NHP2. Protein tetramers assembled with NOP10-R34W were unable to bind U64, U17, U93, E2 or the H/ACA domain of hTR (Figure 4), and this could explain why the R34W mutation causes a decrease in hTR levels *in vivo*, leading to critically short telomeres in DC patients (Walne, Vulliamy *et al.* 2007).

Surprisingly, the NOP10 mutation R34W did not affect pre-RNP assembly with snoRNA ACA36B and scaRNA U92, both of which are miRNA-encoding RNAs (Ender, Krek *et al.* 2008). Since their discovery in humans (Ender, Krek *et al.* 2008), miRNA-encoding H/ACA sno/scaRNAs have also been found in bovine, mouse, chicken, and plants, as well as in *Drosophila* and fission yeast, indicating that they are conserved in all eukaryotes (Glazov, Kongsuwan *et al.* 2009; Miles, McDaneld *et al.* 2009). Our results are pointing out structural differences in pre-RNP assembly between classical sno/scaRNAs and those that

encode miRNAs, and suggest that assembly defects of classical H/ACA RNPs, but not of miRNA-encoding RNPs, may contribute to the variety of abnormalities observed in DC patients. Such structural differences may reflect the ability of DICER to generate miRNAs from certain H/ACA RNAs and not from others. It is not known whether miRNA-encoding H/ACA pre-RNPs assembled with NOP10-R34W can mature into functional pseudouridylating RNPs, or if active miRNAs can be generated from them by DICER. Targets for miRNAs encoded by scaRNA U92 and snoRNA ACA36B have not been identified. However, if active miRNAs were produced with the NOP10-R34W mutant, identification of their targets could help to pinpoint the different molecular pathways affected by the NHP2-V126M or Y139H mutants (which would affect most or all H/ACA RNPs), compared with the NOP10-R34W mutant that seems to spare miRNA-encoding H/ACA RNPs.

#### 3.4.4 Significance to DC

One common feature observed in DC patients is a defect in telomere maintenance, indicating that all mutations causing DC can deregulate the telomere/telomerase pathway. This underscores the intimate link between telomere maintenance and DC (Kirwan et Dokal 2009). Dyskerin, NHP2 and NOP10 are essential components of telomerase, as well as H/ACA snoRNPs and scaRNPs, which are respectively required for pseudouridylation of rRNAs and snRNAs. The role of modified residues in those RNAs is not fully understood. However, pseudouridines appear to be important for rRNA stability and function (Ge, Rudnick *et al.* 2009; Gu, Zhao *et al.* 2009; King, Liu *et al.* 2003; Liang, Liu et Fournier 2009), and for U2 snRNP assembly and function (Yu, Shu et Steitz 1998; Zhao et Yu 2004). Therefore, DC-causing mutations in H/ACA proteins could alter ribosome and spliceosome function, in addition to telomere maintenance.

In the light of our results, we propose that some disorders observed in DC patients harboring mutations in either dyskerin, NOP10 or NHP2 may be related to different pathways of H/ACA RNPs in addition to that of telomerase. Indeed, while the assembly of hTR204 into a pre-RNP was more sensitive than other H/ACA RNAs to the dyskerin mutation A353V,

mutations V126M and Y139H in NHP2 affected all H/ACA RNPs (including those encoding miRNAs), whereas the R34W mutation in NOP10 disturbed only “classical” H/ACA pre-RNPs, but not those encoding miRNAs. This suggests that some disorders might be specific not only to telomerase but also to other H/ACA RNPs in certain patients. This view is supported by the observation that dyskerin mutations A353V and  $\Delta 22C$  affect the levels of mouse telomerase RNA and some but not all H/ACA snoRNAs in ES cells (Gu, Bessler et Mason 2008; Mochizuki, He *et al.* 2004). Therefore, recessive DC mutations in dyskerin, NHP2 or NOP10 might affect the assembly of different H/ACA RNP populations *in vivo*. Our study is the first that clearly shows distinct assembly defects associated with DC-linked mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10. This could open new avenues for screening and developing personalized small molecule therapeutics to treat DC.

### 3.5 Materials and Methods

#### 3.5.1 DNA constructs

The DNA constructs used for *in vitro* protein synthesis of wild-type human NAF1, NHP2 and NOP10 were described previously, as well as those encoding the H/ACA domain of human telomerase RNA (hTR204), the U17 snoRNA, the U92 scaRNA (Trahan et Dragon 2009), and the snoRNAs E2 and U64 (Dragon, Pogacic et Filipowicz 2000).

The cDNA encoding the human scaRNA U93 (Kiss, Jady *et al.* 2002; Lestrade et Weber 2006) was amplified by PCR from HeLa cell genomic DNA with oligonucleotides hU93-F (5'-CCG**GAATTCAATCTGTAGTCTTGGAGCCGCA**-3'; EcoRI site is in bold letters) and hU93-R (5'-GCCT**CTAGAACTTGTGGCAGTACTTAGTGTTC**AAAC-3'; XbaI site is in bold letters), and cloned into the corresponding sites in pBluescript SK(-) to yield pBS-U93. The cDNA encoding the human snoRNA ACA36B (Kiss, Jady *et al.* 2004; Lestrade et Weber 2006) was also amplified by PCR from HeLa genomic DNA with oligonucleotides hACA36B-F (5'-AAAT**TAATACGACTCACTATAGGGAATTC**CAAAGTGTTAAGTTCAGTTCAG-3'; the T7 RNA polymerase promotor sequence is in bold letters) and hACA36B-R (5'-GGGA**AGCTTTTT**GTAGGCTGGGGATAAATG-3'; HindIII site is in bold letters). The PCR product was then phosphorylated with T4 PNK (New England Biolabs), cleaved with HindIII and cloned into SmaI / HindIII sites of pUC19, yielding pACA36B.

The cDNA encoding human dyskerin was amplified by PCR with pcDNA-DKC1 as template (Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000) using oligonucleotides BamHI-DKC1-for (5'-GGGG**ATCCG**GAGAATTTGTATTTTCAGGGTGC GGATGCGGAAGTAATTAT-3') and HindIII-DKC1-rev (5'-TGGGA**AGCTT**CTACTCAGAAACCAATTCTACCTCT-3') in order to add BamHI and HindIII restriction sites at the 5'- and 3'-end, respectively. The PCR product was inserted into the corresponding sites of pRSF-Duet (Novagen) to generate pRSF-DKC1. Site-directed mutagenesis (Higuchi, Krummel et Saiki 1988) of dyskerin cDNA was performed by PCR with pRSF-DKC1 as template to generate the DC dyskerin mutants F36V,

R158W, R322Q, A353V and S420Y. Single PCR amplification was performed on the pRSF-DKC1 template to obtain the 22 amino acid deletion at the C-terminus of dyskerin ( $\Delta 22C$ ). We used the AlwNI restriction site present in the dyskerin cDNA at position 808-816 to generate smaller mutated cDNA fragments. The dyskerin DC mutations located in the 5' cDNA fragment (F36A and R158W) were obtained by cutting the mutated PCR cDNA fragment with NcoI and AlwNI, and exchanging them with the corresponding fragment in pRSF-DKC1, generating pRSF-DKC1-F36V and pRSF-DKC1-R158W. As for the mutations located in the 3' cDNA fragment (S280R, R322Q, A353V, S420Y and the C-terminal deletion), mutagenized PCR cDNA fragments were cut with AlwNI and NotI, and were also exchanged with the corresponding cDNA fragment in pRSF-DKC1 to generate pRSF-DKC1-S280R, pRSF-DKC1-R322Q, pRSF-DKC1-A353V, pRSF-DKC1-S420Y and pRSF-DKC1- $\Delta 22C$ . Similarly, site directed mutagenesis was performed on pGAD-NOP10 (Trahan et Dragon 2009) to create the DC NOP10 mutant R34W cDNA, and on pNHP2 (Trahan et Dragon 2009) to generate the DC NHP2 mutants V126M, Y139H and X154R cDNAs. Mutagenized cDNAs of NOP10 and NHP2 were cleaved with EcoRI and cloned into EcoRI site of pGAD-T7 and pcDNA3.1, respectively, to yield pGAD-NOP10-R34W, pNHP2-V126M, pNHP2-Y139H and pNHP2-X154R. The sequences of oligonucleotides used for generating mutants of dyskerin, NHP2 and NOP10 are available on request. Integrity of all constructs was verified by automated sequencing at the McGill University and Génome Québec Innovation Center.

### 3.5.2 *In vitro* transcription of radiolabeled RNAs

All plasmids used for *in vitro* transcription were linearized with the proper restriction enzymes, as described previously (Trahan et Dragon), and with HindIII (for E2 and ACA36B) or XbaI (for U93). Radiolabeled hTR204, U92, U93, U64, U17 were synthesized with T7 RNA polymerase (Ambion) or T3 RNA polymerase for the E2 RNA (Ambion) in a mixture (20  l) containing 1.5   g of linearized DNA template, 40 mM Tris-HCl (pH 7.9), 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM dithiothreitol, 10 mM NaCl, 2 mM spermidine, 0.5 mM ATP, 0.5 mM CTP, 0.11 mM GTP, 0.5   M UTP, 16 U of RNasin (Promega), and 20   Ci of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP (800 Ci/mmol; PerkinElmer). Reactions were stopped by adding one tenth volume of EDTA 0.5M

pH 8.0 to the mixtures. RNAs were then purified on denaturing poly-acrylamide gels and eluted in 400  $\mu$ l of  $\text{NH}_4\text{OAc}$  0.5 M,  $\text{Mg}(\text{OAc})_2$  10 mM, EDTA 1 mM, and 0.1% SDS. Eluted RNAs were extracted with phenol-chloroform and ethanol precipitated in the presence of glycogen (20  $\mu$ g). Pellets were dissolved in 40  $\mu$ l of  $\text{H}_2\text{O}$  and counted (Trahan et Dragon 2009).

### 3.5.3 *In vitro* protein synthesis, RNP assembly and IPs

Protein synthesis, RNP assembly, IPs and the analysis of complexes were done as described previously (Trahan et Dragon 2009), with the following changes. Antibody-coated beads were always centrifuged at  $800 \times g$  for 1 minute, and immunoprecipitates were eluted by heating the beads at  $90^\circ\text{C}$  for 3 min in 30  $\mu$ l of XT loading buffer (Bio-Rad). Heated samples were gently mixed before centrifugation, and 25  $\mu$ l of the mixtures were loaded on Criterion gradient gels (Bio-Rad). When required, IPs were carried out with 12CA5 anti-HA mouse monoclonal antibody.

### 3.5.4 *In silico* structure predictions and multiple sequence alignments

Protein structure predictions were generated by I-TASSER on Zhang-Server <http://zhang.bioinformatics.ku.edu/I-TASSER/> (Wu, Skolnick et Zhang 2007; Zhang 2007; Zhang 2008). Images of superimposed structures were produced with PyMOL software (DeLano Scientific LLC) using the I-TASSER generated PDB files. Multiple sequence alignments of NHP2 and NOP10 from various organisms were done with ProbCons (Do, Mahabhashyam *et al.* 2005), and residues showing over 40% and 30% homology for NHP2 and NOP10, respectively, were shaded with Box Shade 3.21.

## 3.6 Acknowledgments

We are greatly indebted to Yves Henry (Université de Toulouse, France) for the generous gift of NAF1 antibodies, and to Steve Reichow and Gabriele Varani (University of

Washington, U.S.A.) for critical reading of the manuscript. We gratefully thank our colleague Diana Averill for help with English corrections, and Céline Bontemps for technical assistance with cloning of dyskerin mutants. This work was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research CIHR (MOP-64290) and a Chercheur-boursier award of the Fonds de la recherche en santé du Québec to FD.

### 3.7 Figure legends

**Figure 3.1:** Formation of protein tetramers with dyskerin mutants. NAF1 IPs were conducted on RRLs programmed for  $^{35}\text{S}$ -labeled protein mixtures containing either wild-type dyskerin (lanes 1-2) or various dyskerin mutants linked to DC (lanes 5-18). Inputs (T) and recovered IPs (IP) were analyzed by PAGE (indicated by odd and even numbered lanes numbers, respectively). Omission of NAF1 in a programmed RRL was used as negative IP control (lanes 3-4) to allow monitoring of the background levels caused by endogenous H/ACA proteins in RRL. The position of each protein is indicated on the right.

**Figure 3.2:** Formation of pre-RNPs with dyskerin mutants. (A) Programmed RRLs (as in Figure 1) were incubated with  $^{32}\text{P}$ -labeled hTR204 prior to NAF1 IPs, and pre-RNPs were analyzed by PAGE (upper panel). Because hTR204 co-migrates with dyskerin and is in large excess compared to the translated proteins, input lanes (odd numbers), did not contain the  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA to better discern the  $^{35}\text{S}$ -labeled proteins. The upper panel shows the image obtained for both protein ( $^{35}\text{S}$ ) and RNA ( $^{32}\text{P}$ ) signals emanating from the dried gel. The lower panel shows only the  $^{32}\text{P}$  signal of co-immunoprecipitated hTR204 RNA; to block the  $^{35}\text{S}$  signal, the dried gel was covered with a transparency prior to exposure to the phosphore screen. As in Figure 1, omission of NAF1 in the RRL mixture was used as negative IP control to monitor the background RNA signal caused by endogenous proteins in RRL (lanes 3-4). (B) The RNA signal obtained from NAF1 IPs carried out with pre-RNPs reconstituted as in (A) with U92 scaRNA (upper panel) and U64 snoRNA (middle panel). The U17 snoRNA (lower panel) was assembled with RRL-programmed trimers of dyskerin-NOP10-NHP2 (indicated by an asterisk; see text for details). U17 RNPs were immunoprecipitated *via* HA-NOP10, and an RRL mixture lacking HA-NOP10 was used as negative control for HA IPs (lanes 3-4).



**Figure 3.3:** Some DC mutations in NHP2 affect protein tetramer formation. **(A)** RRLs were programmed for labeled tetramers harboring either wild-type NHP2 or one of the three NHP2 mutants associated with DC: V126M, Y139H or X154R, which migrates higher in the gel (indicated by an arrowhead) due to the 51 amino acid extension at the C-terminus. Protein complexes were isolated by NAF1 IPs and analyzed as described in Figure 1. **(B)** The RRL programmed mixtures as in (A) were incubated with radiolabeled hTR204 before proceeding with IPs of NAF1 (see Figure 2A for details). **(C)** Assembly of U92, U64 and U17 RNPs was also investigated in the context of NHP2 mutants (see Figure 2B for details).

**Figure 3.4:** Mutation R34W in NOP10 blocks pre-RNP formation. **(A)** The ability of the DC-linked NOP10 mutant to form a tetramer with dyskerin, NHP2 and NAF1 was examined as in Figure 1. **(B)** Analysis of hTR204 pre-RNP assembly in the presence of NOP10-R34W. Programmed RRLs as in (A) were incubated with radiolabeled hTR204 prior to NAF1 IPs (as in Figure 2A). The lower panel shows only the  $^{32}\text{P}$  signal radiating from hTR204. **(C)** RNP assembly with radiolabeled U64, U17, U93, E2, ACA36B and U92 was also examined in the context of tetramers formed with NOP10-R34W, as in Figure 3C. **(D)** The protein gel used to analyze ACA36B and E2 pre-RNPs in (C) was overexposed (top panel). RNAs from each IP supernatant were extracted and separated on a denaturing polyacrylamide gel (lower panel).

**Figure 3.5:** *In silico* modeling of DC mutants. **(A)** The best 3D prediction of wild-type NHP2 obtained with I-TASSER (cyan) is superimposed on the structure of L7Ae (black) obtained from the sRNP crystal (2hvy) of *P. furiosus* (Li et Ye 2006). For better discernment of the aNop10-L7Ae interface (orange) and a better view of the superimposed NHP2, we removed the atomic coordinates of aCbf5, aGar1 and the Afu46 sRNA hairpin from the sRNP structure. Residues V126 and Y139 of wild-type NHP2 are shown in yellow, and aNop10 is in blue. A 90° rotation of the left image is shown on the right. Predicted 3D models of NHP2 mutants V126M **(B)** and Y139H **(C)** are shown in red, and both models are superimposed on wild-type NHP2 as in the left and right images of (A), respectively. **(D)** Close up view of aNop10 (blue) with Afu46 hairpin (orange) from the *P. furiosus* sRNP crystal onto which the predicted structure of wild-type NOP10 (cyan) was superimposed. For clarity, atomic coordinates of aCbf5, aGar1 and L7Ae were eliminated. Nucleotides C18 and C19 of Afu46

are in green and U32 and G33 are in grey. Hydrogen bonds formed between residue R34 of aNop10 and the RNA are shown by red dotted lines. (E) The predicted structure of DC mutant NOP10-R34W (red) is overlaid on the aNop10 structure, as in (D).

**Figure 3.6:** Multiple alignments of NHP2 and NOP10 proteins from various organisms. The sequence of human NHP2 (NP\_060308) (A) and NOP10 (NP\_061118) (B) were compared to four vertebrate, five invertebrate and five archaeal homologues. They consist of *Bos taurus* (Bt; NP\_001015626 and NP\_001107993), *Mus musculus* (Mm; NP\_080907 and NP\_079679), *Danio rerio* (Dr; NP\_997762 and NP\_001003868), *Xenopus laevis* (Xl; NP\_001084534) and *Xenopus tropicalis* (Xt; NP\_001016163), *Drosophila melanogaster* (Dm; NP\_651965 and NP\_610610), *Caenorhabditis elegans* (Ce; NP\_499415 and NP\_492679), *Arabidopsis thaliana* (At; NP\_196435 and NP\_565472), *Schizosaccharomyces pombe* (Sp; NP\_594717 and NP\_593418), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc; NP\_010073 and NP\_058135), *Archaeoglobus fulgidus* (Af; NP\_069598 and NP\_069362), *Sulfolobus solfataricus* (Ss; NP\_341659 and NP\_342525), *Thermococcus kodakarensis* (Tk; YP\_183724 and YP\_183514), *Methanocaldococcus jannaschii* (Mj; NP\_248198 and NP\_247081), and *Pyrococcus furiosus* (Pf; NP\_579096 and NP\_578870). The schematic secondary structure of L7Ae is that of Li and Ye (43), while those of archaeal aNop10 and yeast Nop10p were taken from Reichow and Varani (49). Asterisks indicate the RNA interacting residues. Open and black circles indicate the aNop10-L7Ae and aNop10-aCbf5 interacting residues, respectively. DC mutations found in NHP2 and NOP10 are shown above the alignments.

3.8 Figures

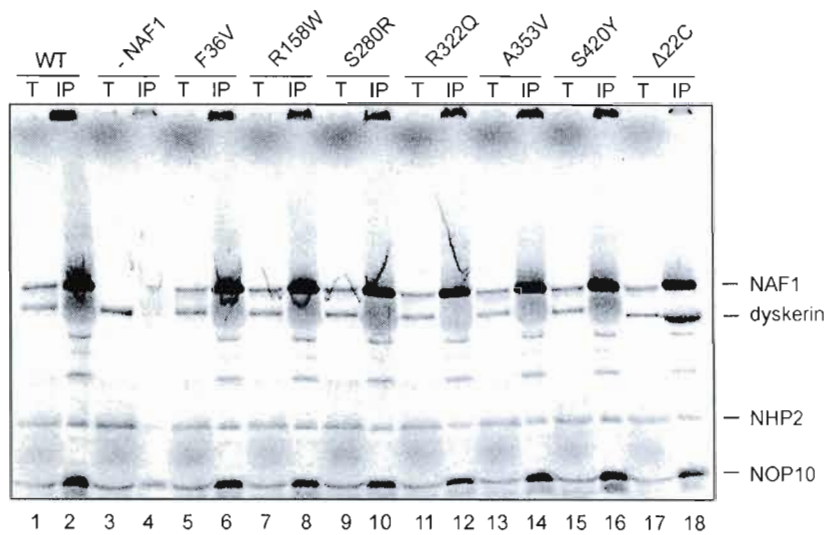
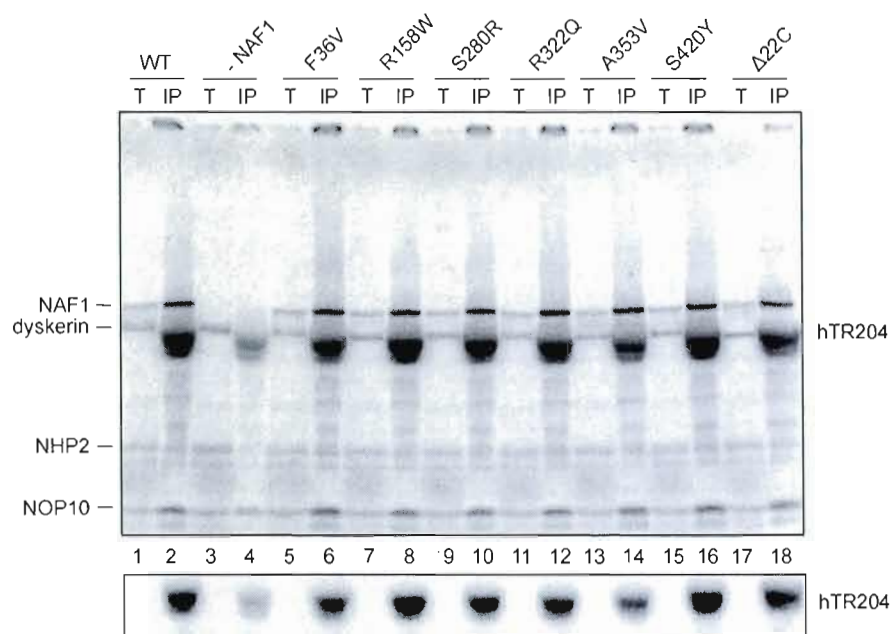


Figure 3.1

A



B

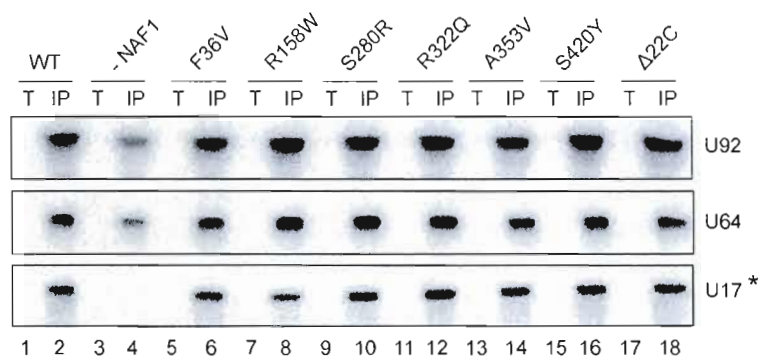


Figure 3.2

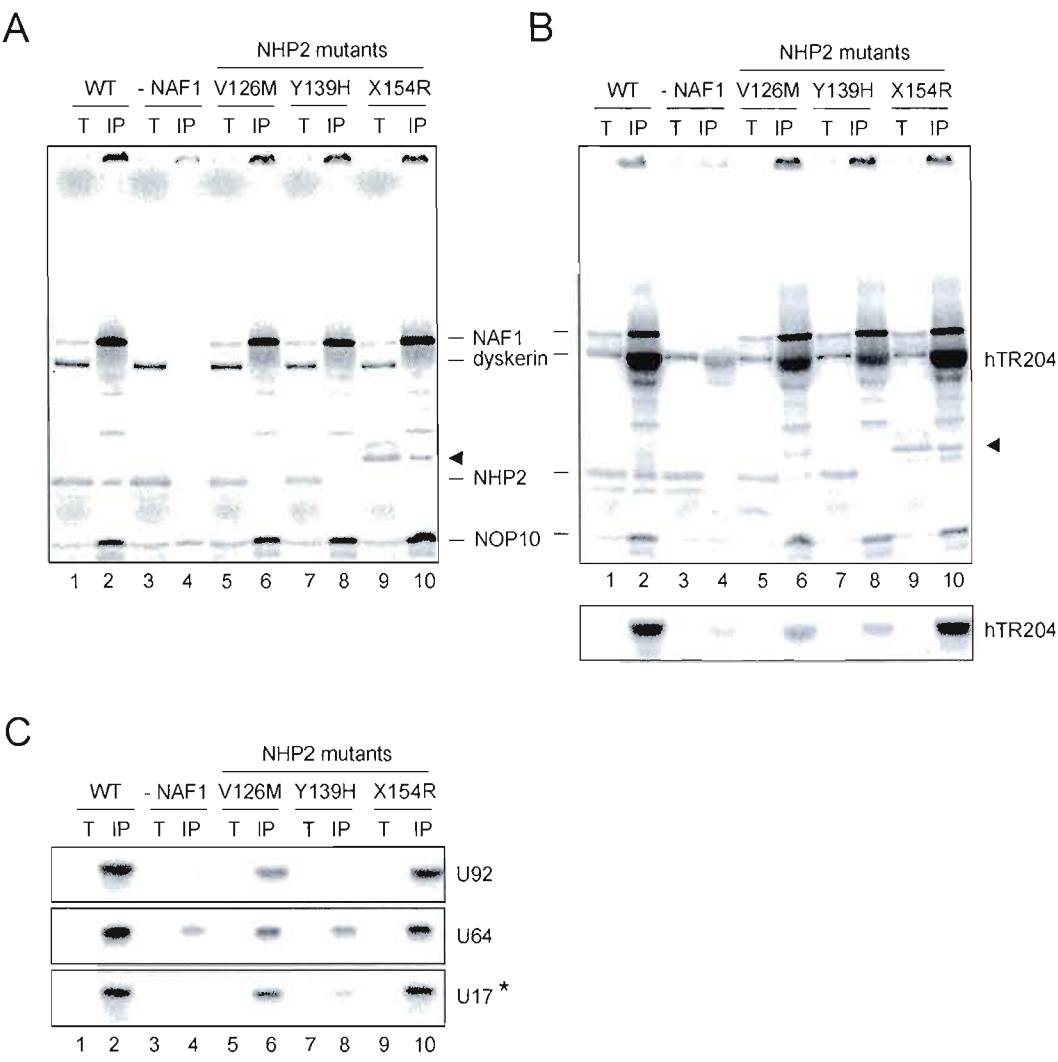


Figure 3.3

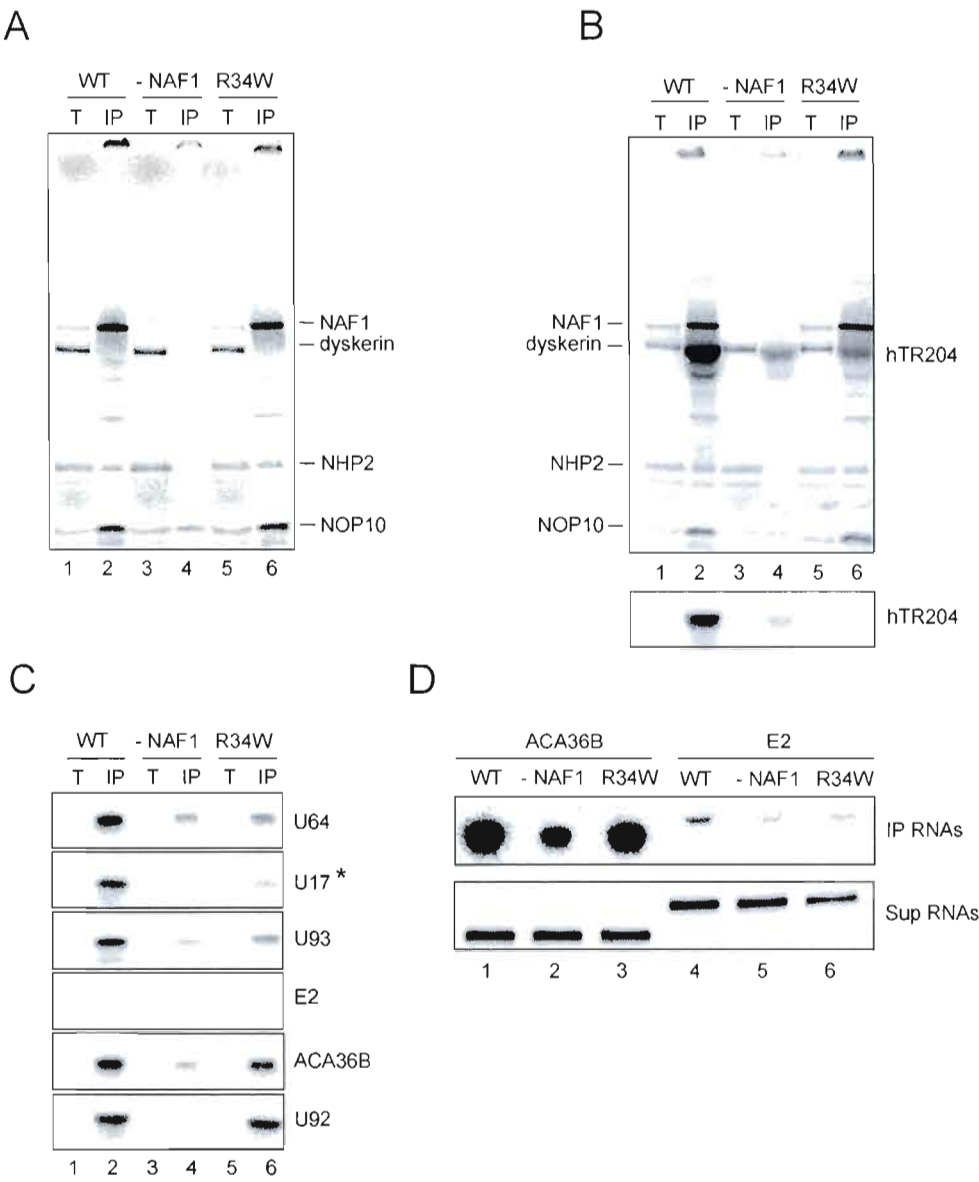


Figure 3.4

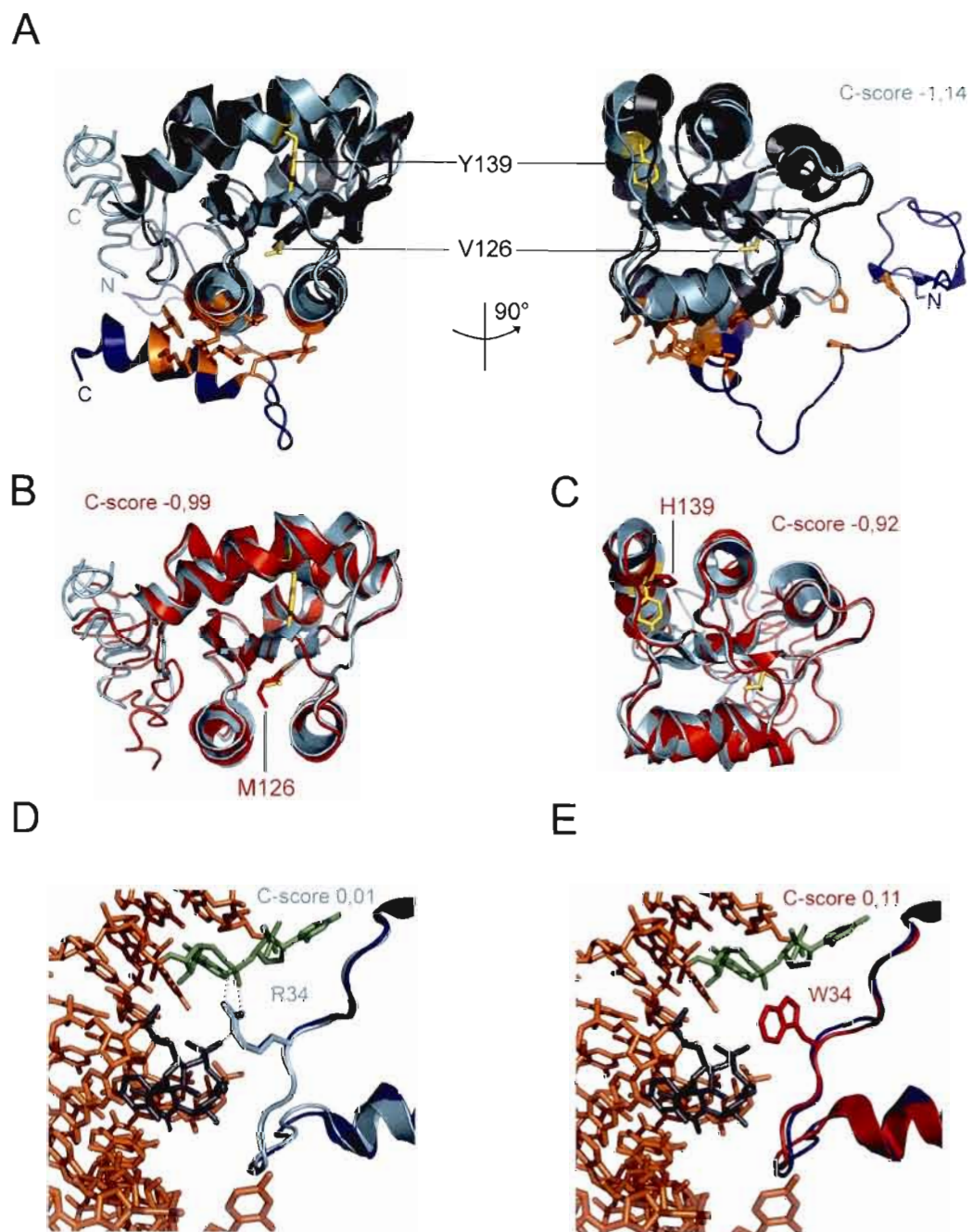
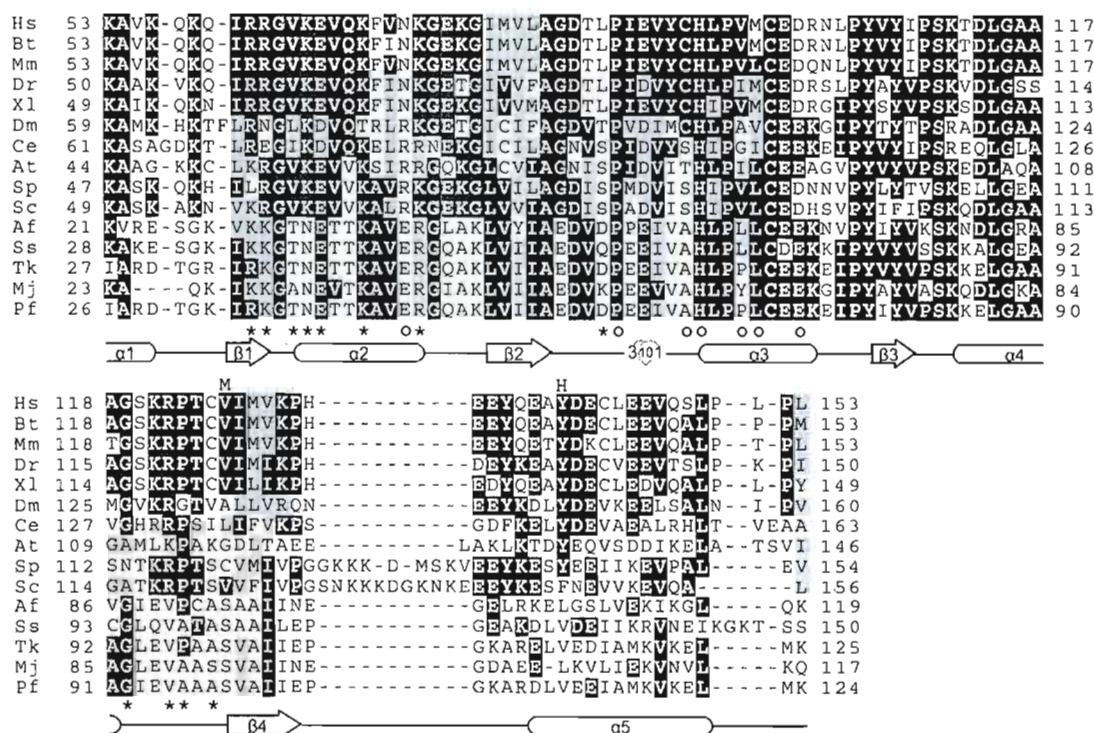


Figure 3.5



A



B

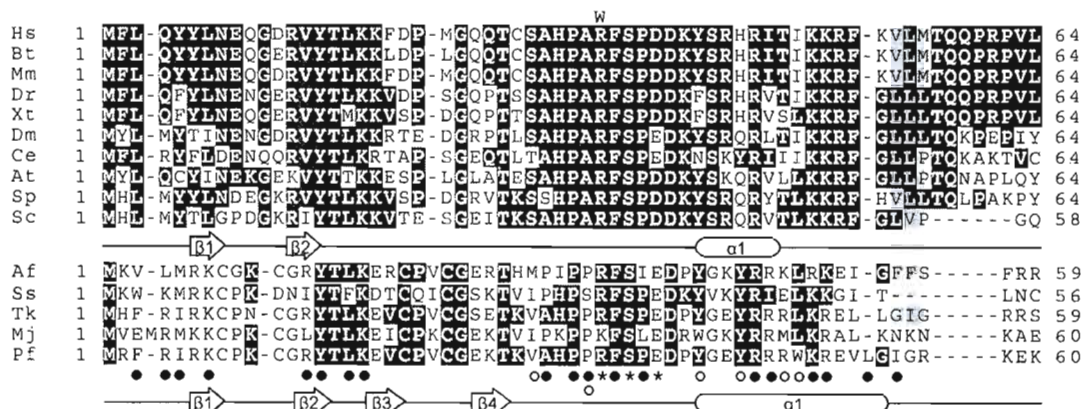


Figure 3.6



## CHAPITRE IV

### ANALYSE DE L'EXTRÉMITÉ 3' DE HTR AYANT ÉTÉ MATURÉS *IN VIVO*.

#### AVANT PROPOS

Comme la mutation G450A reliée à l'anémie aplasique dans le domaine H/ACA de hTR ne cause pas de problème d'accumulation de hTR *in vivo* ni de problèmes d'assemblage de pré-RNP *in vitro* (Chapitre I), le défaut provoqué par cette mutation doit nécessairement se situer à un autre niveau. Il est quand même curieux que la substitution de l'avant dernier nucléotide de hTR, qui devrait pouvoir être n'importe quel nucléotide selon la règle de l'extrémité 3' des ARN H/ACA (ACANN-3'OH) puisse engendrer un désordre aussi important qu'une anémie aplasique. Nous avons remarqué que dans le contexte génomique, la mutation G450A pourrait générer une nouvelle boîte ACA quatre nucléotides en amont de la boîte ACA originale, ce qui pourrait avoir comme effet de générer des molécules de hTR qui sont quatre nucléotides plus long selon la règle des ARN H/ACA. Pour tester notre hypothèse, j'ai exprimé hTR de type sauvage ainsi que des variantes de ce dernier à partir de plasmides transfectés dans des cellules qui n'expriment pas hTR, et j'ai procédé à l'analyse de l'extrémité 3' de hTR et ses dérivés par 3' RLM-RACE.

#### Contributions :

J'ai moi-même élaboré et mis au point le système de 3' RLM-RACE utilisé lors de cette étude, effectué les expériences et interprété les résultats sous la supervision du Dr François Dragon. J'ai également contribué à la majeure partie de la rédaction de l'article avec l'aide du Dr François Dragon. Élodie Geneletti a participé à la confection du plasmide G450A-hTR-500. Ahmed Hossain a réalisé le clonage de certains produits de 3' RLM-RACE pour chacune des expériences afin d'obtenir un plus grand nombre de séquences pour chacune des analyses 3' RLM-RACE effectuées dans cette étude.

## **3'-end maturation of human telomerase RNA precursor.**

Christian Trahan and François Dragon\*

Département des sciences biologiques and Centre de recherche BioMed  
Université du Québec à Montréal, Montréal, Québec, H3C 3P8, Canada

\*Correspondence: [dragon.francois@uqam.ca](mailto:dragon.francois@uqam.ca)

Office: 1-514-987-3000 ext. 2063

Fax: 1-514-987-4647

Running title: 3'-end maturation of hTR

Keywords: Telomerase biogenesis, hTR maturation, hTR precursor, oligoadenylation

## 4.1 Abstract

Telomerase is a ribonucleoprotein enzyme that mediates the elongation of telomeres located at chromosomes ends. The RNA component of human telomerase (hTR) is constituted of 451 nucleotides and belongs to the H/ACA class on non-coding RNAs. A number of disease-linked mutations have been mapped to hTR. One of those mutations, the G450A substitution that changes the next to last residue of hTR, has been linked to aplastic anaemia. In this study, we used the hTR-negative VA-13 cell line to express plasmid-borne hTR constructs, each of which was under the control of hTR's natural promoter and flanked by about 500 bp of downstream genomic sequence. The 3'-end of hTR molecules was analyzed by 3' RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends (3' RLM-RACE). Results revealed the presence of nearly mature hTR molecules with heterogeneous 3'-ends, some of which were oligoadenylated. We found that 3'-end maturation is more efficient in hTR-positive HeLa and BeWo cells. This suggests that elements downstream of the 500 nucleotides that flank the sequence of hTR, or factors associated with them, may contribute to the efficient 3'-end maturation of hTR. We also detected oligoadenylation of nearly mature hTR transcripts in HeLa and BeWo cells, indicating that this process normally occurs *in vivo*. The implication of such oligoadenylation remains unknown: it could be one of the final processing steps that lead to 3'-end formation of mature hTR, or it could constitute a tag to target those RNAs for degradation in order to maintain adequate cellular levels of hTR.

## 4.2 Introduction

Chromosome extremities in *Eukarya* are termed telomeres. They consist of repeated DNA sequences (telomeric DNA) with a 3' overhang extension. The 3' overhang folds back into the telomeric DNA repeats in association with proteins to form a cap structure that prevents chromosomal extremities from end-to-end fusion or to be recognized as damaged DNA by the cell. Linear chromosomes are problematic for the DNA replication machinery: synthesis of the lagging strand is initiated by Okasaki fragments that are degraded afterward, producing a 5'-end that is shorter than the parental strand's 3'-end (Shore et Bianchi 2009). The erosion of telomeres is a process that could be viewed as a biological clock that limits the renewal or the maintenance of tissues and organs, leading to aging, senescence and ultimately, natural death.

Telomerase is an enzymatic ribonucleoprotein particle that catalyses the elongation of eukaryotic chromosome ends. It is mainly detected in germinal and stem cells, while most somatic cells normally do not contain active telomerase. The enzymatic activity of this RNP is mediated by a reverse transcriptase (TERT) and its associated RNA component (TERC) that harbors the telomeric DNA template required for reverse transcription by TERT. While the pseudoknot domain containing the telomeric template is a universal feature of TERCs, the 3' portion of vertebrate TERCs folds into a structure that is similar to sno/scaRNAs of the H/ACA class (Chen, Blasco et Greider 2000).

The sno/scaRNAs can be separated in two large families, box H/ACA RNAs and box C/D RNAs. Each class adopts a distinct and characteristic secondary structure and associates with a different set of nucleolar proteins. Box C/D RNAs generally serve as guides for 2'-O-ribose methylation reactions, and H/ACA RNAs mainly act as guides for the pseudouridylation. These post-transcriptional reactions are carried out on rRNAs and snRNAs by snoRNPs and scaRNPs, respectively (Matera, Terns et Terns 2007). All H/ACA RNAs share a common fold consisting of a hairpin followed by a single-stranded hinge region containing box H (consensus sequence ANANNA, where N is any nucleotide), another hairpin, and a single-stranded tail harboring the ACA box positioned exactly three

nucleotides from the 3'-end (ACANN-3'OH) (Balakin, Smith et Fournier 1996; Ganot, Caizergues-Ferrer et Kiss 1997). While no pseudouridylation targets were found for the H/ACA domain of vertebrate TERC (also named hTR for the human Telomerase RNA), this domain is essential for the accumulation of hTR *in vivo* (Mitchell, Cheng et Collins 1999).

With the exception of hTR, all known H/ACA RNAs are encoded within introns of pre-mRNAs in humans (Kiss 2004). hTR is transcribed by RNA polymerase II from its own promoter, it possesses a TMG cap at its 5'-end, and the precursor of hTR is processed at its 3'-end to yield a mature RNA of 451 nucleotides (Feng, Funk *et al.* 1995; Fu et Collins 2006; Hinkley, Blasco *et al.* 1998; Zaug, Linger et Cech 1996). This processing pathway is similar to that of yeast H/ACA snoRNAs, which are generally produced from monocistrons by RNA polymerase II (Piekna-Przybylska, Decatur et Fournier 2007).

Fu and Collins (2003) developed a system that takes advantage of hTR-negative cells to express plasmid-borne hTR, and they showed that all elements required for proper 3'-end maturation of hTR are located within its H/ACA domain. This suggests that H/ACA RNP assembly is needed to prevent degradation of nascent hTR transcripts by the 3' processing machinery. There are evidences that H/ACA RNAs are efficiently assembled into pre-RNPs with H/ACA-specific proteins in a co-transcriptional manner in yeast and humans. Although most human H/ACA RNAs are intronic, it was shown that splicing factors are not involved in H/ACA pre-RNP assembly (Ballarino, Morlando *et al.* 2005; Darzacq, Kittur *et al.* 2006; Fatica, Dlakic et Tollervey 2002; Richard, Kiss *et al.* 2006; Yang, Hoareau *et al.* 2005). Thus, the majority of intronic and monocistronic H/ACA RNAs of yeast and humans may be assembled into pre-RNPs in a similar fashion.

In this report we used the VA-13 cell system of Fu and Collins (2003) described above in combination with the very sensitive 3' RLM-RACE method to analyze 3'-end maturation of plasmid-borne wild-type hTR as well as that of two mutant derivatives of hTR, the G450A mutant that is associated with aplastic anaemia and a box ACA mutant that cannot be assembled into a pre-RNP (Trahan et Dragon 2009). We also analyzed the 3'-end of hTR

that is endogenously processed in HeLa and BeWo cells. Our data show that nearly mature hTR molecules are oligoadenylated.

### 4.3 Results and Discussion

Various mutations causing dyskeratosis congenita or aplastic anemia have been mapped to hTR, which is constituted of 451 nucleotides and belongs to the H/ACA class of non-coding RNAs. Of those mutations, the G450A substitution involving the next to last residue of hTR has been linked to aplastic anemia (Figure 1) (Vulliamy et Dokal 2008). It is somehow curious that this mutation can cause a disease as severe as aplastic anaemia because, according to the H/ACA consensus rule, the identity of the last three residues following box ACA is not important (the consensus 3'-end is ACANNN-3'OH) (Balakin, Smith et Fournier 1996). We noted that an adenine follows the 3'-end of mature hTR in the genomic sequence. Because hTR is processed at its 3'-end from a longer precursor (Fu and Collins 2003), the G450A mutation could create a novel ACA box two nucleotides downstream of the original one (**ACA**UACA; the original ACA box is in bold, and the alternative ACA box is underlined). This led us to hypothesize that, if the alternative ACA box is recognized as a true ACA box and the ACANNN-3'OH rule is applied, hTR molecules bearing the G450A mutation should be four residues longer than the wild-type hTR.

#### 4.3.1 3'-end processing of hTR is unaffected by the aplastic anemia mutation

##### G450A.

To determine that all elements necessary for 3'-end processing of hTR are located in its H/ACA domain, Fu and Collins (2003) transfected diverse DNA constructs into hTR-negative VA-13 cells, and they analyzed the processed hTR transcripts by Northern hybridization. One of the plasmid constructs was a pBluescript derivative containing a cDNA fragment encompassing the natural promoter of hTR followed by its 451-nt coding sequence and about 500 bp of downstream genomic sequence (construct WT-hTR-500). To verify our hypothesis we used the *in vivo* system developed by Fu and Collins (2003). A G450A mutant derivative of the WT-hTR-500 construct was generated by site-directed mutagenesis and it was named G450A-hTR-500. The wild-type and mutant constructs were

separately transfected in VA-13 cells, and the 3'-ends of the processed transcripts were mapped by 3' RLM-RACE (see Materials and Methods for details). As shown in Table I, both wild-type hTR and the G450A mutant derivative presented heterogeneous, nearly mature 3'-end sequences. Nevertheless, we did not find any clone with the predicted **ACA**UACAGUU 3' sequence, which would have indicated that the G450A mutant contained four extra nucleotides relative to wild-type hTR. This suggested that our hypothesis of an extended 3'-end for the G450A mutant was wrong. In addition, 3'-end maturation of the G450A mutant derivative was not less efficient compared to wild-type hTR (Table I, and data not shown). Surprisingly however, some of those nearly mature fragments were oligoadenylated.

#### 4.3.2 Impairment of RNP assembly and RNA degradation.

Fu and Collins (2003) showed that plasmid-borne hTR bearing a mutation in box ACA failed to accumulate at levels that can be detected by Northern hybridization. Because 3' RLM-RACE is a more sensitive method, we chose to use this procedure to analyze 3'-end formation of hTR transcripts bearing a mutated ACA motif. A point mutation was inserted in box ACA (ACA→GCA) of the WT-hTR-500 construct. The novel A446G-hTR-500 construct was transfected in VA-13 cells, and its transcripts were analyzed by 3' RLM-RACE. We could not detect any mature or nearly mature hTR transcripts expressed from the A446G-hTR-500 construct. However, we identified smaller fragments of very low abundance. Those fragments harbored heterogeneous 3'-ends, which mapped to the 5' stem-loop and H box of the H/ACA-like domain (Figure 2). Remarkably, none of them were oligoadenylated (data not shown). Moreover, expression of a construct bearing both the A446G and G450A mutations, which could have pushed the use of the alternative ACA box (see above), did not improve formation of mature or nearly mature hTR molecules (data not shown). It is presumed that the ACA motif of hTR interacts with the PUA domain of dyskerin, as it is the case for archaeobacterial H/ACA sRNAs (Li et Ye 2006); (Baker, Seyfried *et al.* 2008), and this interaction is crucial for RNP assembly. We have previously shown that the A446G mutation in box ACA abrogates RNP assembly of the H/ACA domain of hTR with H/ACA specific proteins in an *in vitro* system (Dragon, Pogacic et



Filipowicz 2000; Trahan et Dragon 2009). Taken together, these results suggest that smaller hTR fragments are being degraded in the absence of H/ACA RNP assembly, in line with the results of Fu and Collins (2003).

#### 4.3.3 Oligoadenylation of nearly mature endogenous hTR.

To determine if 3'-end heterogeneity and oligoadenylation of some nearly mature hTR molecules were artifacts of VA-13 cells expressing plasmid-borne hTR, we carried out 3' RLM-RACE on total RNA isolated from hTR-positive HeLa and BeWo cell lines. Results from these experiments show that 3'-end maturation of endogenous hTR was much more efficient than in transfected VA-13 cells (Table II). Notably, we observed less heterogeneity in comparison with transfected VA-13 cells, and most sequences ended at the mature 3'-end. Fu and Collins (2003) reported that endogenous hTR precursors might have 3'-end extensions that are longer than 500 residues. Because plasmid-borne hTR precursors expressed in VA-13 cells contain 3'-end extensions that are limited to about 500 nucleotides, our results suggest that elements located downstream of those 500 residues might contribute to efficient processing of endogenous hTR. Nonetheless, as seen with transfected VA-13 cells, we identified nearly mature hTR molecules that were oligoadenylated, indicating that this process normally occurs *in vivo*. It appears that such oligoadenylation unlikely results from polyadenylation since no polyadenylated intermediates were detected in our 3' RLM-RACE experiments.

Oligoadenylation of nearly mature snoRNA precursors has been observed in yeast (Grzechnik et Kufel 2008). According to a recent model of yeast snoRNA processing, once transcription termination of pre-snoRNAs involving Nrd1/Nab3 has occurred, the released pre-snoRNAs are oligoadenylated by Trf4 and are further polyadenylated by Pap1, before being processed by the exonuclease Rrp6. Grzechnik and Kufel (2008) showed that snoRNAs still accumulated in the Rrp6-depleted strain, indicating that Rrp6 is not the sole exonuclease responsible for maturation of snoRNAs in yeast. These authors also reported the presence of oligoadenylated snoRNA transcripts that were almost completely matured at their 3'-end. The implication of Trf4 in generating those nearly mature, oligoadenylated

snoRNAs was discarded since co-depletion of Rrp6 and Trf4 did not prevent their formation (Grzechnik et Kufel 2008). The protein involved in this oligoadenylation remains unidentified, and this process may be homologous to the process responsible for the oligoadenylation of nearly matured hTR molecules identified in this study.

#### 4.4 Conclusion

Although it appears that assembly of the H/ACA domain of hTR into an RNP, which occurs in a co-transcriptional manner, is sufficient for the accumulation of mature or nearly mature hTR, elements located in the 3' extension of hTR precursors could contribute to efficient 3'-end processing. Our data suggest that these elements lie downstream of the 500 nt flanking the 3'-end of hTR. Interestingly, nearly mature hTR molecules were subjected to oligoadenylation. The reason for such oligoadenylation is not yet understood. It may either constitute a signal for a final processing step that produces the mature 3'-end of hTR, or it could be a tag for RNA degradation.

## 4.5 Materials and methods

### 4.5.1 DNA constructs

Plasmid WT-hTR-500 was a kind gift of Dr. Kathleen Collins (University of California at Berkeley). It codes for hTR under the control of its natural promoter, with about 500 base pairs of genomic sequence after the hTR coding sequence (Fu et Collins 2003). Site-directed mutagenesis (Higuchi, Krummel et Saiki 1988) was carried out on WT-hTR-500 to insert the G450A and the A446G mutations in the coding sequence of hTR. The PCR-amplified mutagenized fragments were cleaved with *Stu*I and *Hind*III, and exchanged with the corresponding fragment of WT-hTR-500 to generate G450A-hTR-500 and A446G-hTR-500, respectively. The integrity of the constructs was verified by automated sequencing at the McGill University and Génome Québec Innovation Center.

### 4.5.2 Cell culture

All cell lines were purchased from ATCC. The telomerase-negative cell line VA-13 was grown in MEM medium, HeLa cells were cultured in DMEM, and BeWo cells were propagated in F-12K medium. All media were supplemented with 10% FBS (WISSENT Inc.) and cells were grown at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### 4.5.3 Transfections

Four micrograms of plasmid DNA (WT-hTR-500, G450A-hTR-500 or A446G-hTR-500) were transfected in VA-13 cells ( $5 \times 10^6$  cells/ml) using a MicroPorator MP-100 equipped with a 10- $\mu$ l tip (NanoEn Tek Inc.). Transfection conditions were set for two pulses of 1575 V separated by 5 milliseconds. Cells were then incubated for 24 hours before being harvested for total RNA preparation. Transfection efficiency was about 70% as determined by transfection with p $\beta$ act-EGFP, which encodes enhanced green fluorescent protein (Pogacic, Dragon et Filipowicz 2000).

#### 4.5.4 RNA preparation

Total RNA from HeLa, BeWo and transfected VA-13 cells was prepared with RNeasy (QIAGEN). To eliminate DNA contamination, digestion with DNase I (QIAGEN) was carried out on the RNeasy columns, as recommended by the manufacturer.

#### 4.5.5 3' RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends (3' RLM-RACE)

An amount of 200 pmoles of 3' adenylated linker miRCat-33 (Integrated DNA Technologies) was ligated to 900 ng of total RNA in 20  $\mu$ l containing 50 mM Tris-HCl, pH 7.8, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 50  $\mu$ g/ml BSA, 15% DMSO, 20 units of RNasin (Promega) and 200 units of truncated T4 RNA ligase 2 (New England Biolabs). Ligation mixtures were heated at 65°C for 5 min and then put immediately on ice. RNasin and truncated T4 RNA ligase 2 were then added to the mixture. Ligation reactions were done at room temperature for two hours. RNAs were then cleaned up with RNeasy columns (QIAGEN) and eluted with 31  $\mu$ l of elution buffer. Two 9.7- $\mu$ l aliquots of ligated RNAs eluates were used for reverse transcription (RT). One of the two aliquots was used as negative control for reverse transcription, i.e. no reverse transcriptase was added to the RT mixture. RNAs were first mixed with 4  $\mu$ l of 10  $\mu$ M miRCat-33 oligo and 2  $\mu$ l of AffinityScript 10X buffer (Stratagene), and denatured at 65°C for 5 min. Hybridization was done at 45°C for 10 minutes before putting samples on ice. RNasin, dNTPs, DTT and AffinityScript reverse transcriptase (Stratagene) were then added to the samples and incubated at 50°C for one hour. RT products were treated with 0.1 mg/ml of DNase-free RNase A (Sigma) for 15 minutes at room temperature. QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) was used to clean the first cDNA strands, and elution was done with 43.5  $\mu$ l of elution buffer. PCRs were setup using all of the eluted first strand cDNAs using PfuUltra II Fusion HS DNA polymerase (Stratagene) following the manufacturer's recommendations. For PCR amplification, the miRCat-33 antisense oligonucleotide was used in combination with oligonucleotide hTR72-88 (5' CGC CGT GCT TTT GCT CC 3') that encompasses residues 72 to 88 of hTR. Initial denaturation was done at 95°C for 1 min, followed by 40 cycles consisting of a 20-sec denaturation at 95°C, a 20-sec hybridization at 50°C and a 30-sec elongation at 72°C. A final

elongation step was done at 72°C for 3 min. PCR products were separated on 1.5 % agarose gels containing 0.5X TBE buffer and GelRed (Biotium). Amplicons were isolated with the QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN) and digested with EcoRI (60 U) in a final volume of 60 µl (EcoRI cleaves in the miRCat-33 linker). The reactions were cleaned up using QIAquick PCR purification kit. EcoRI-cleaved amplicons were then phosphorylated in a 60 µl reaction mixture containing T4 DNA ligase buffer (New England Biolabs), 15 U of T4 polynucleotide kinase (New England Biolabs) and 5 % polyethylene glycol 8000. T4 PNK was heat-inactivated for 20 minutes at 65°C. Digested cDNAs were then ligated into the EcoRV and EcoRI restriction sites of pBluescript SK(-). Ligation products were transformed in *E. coli* DH10 competent cells, and clones were sequenced with the T7 primer at the McGill University and Génome Québec Innovation Center.

#### 4.6 Acknowledgement

We are grateful to Dr. Kathleen Collins (University of California at Berkeley) for the WT-hTR-500 plasmid, and to our colleagues Amadine Vargas and Dr. Benoit Barbeau for the gift of BeWo cells. We thank Élodie Geneletti and Ahmed Hossain for technical assistance. This research was supported by a grant from the Canadian Institutes for Health Research CIHR (MOP-64290) and a Chercheur-boursier award of the Fonds de la recherche en santé du Québec to FD.

## 4.7 Tableaux

**Tableau 4.1:** 3'-end of hTR transcripts expressed from WT-hTR-500 and G450A-hTR-500 in VA-13 cells.

WT-hTR-500			G450A-hTR-500		
Mature 3'-end	3' flanking sequence		Mature 3'-end	3' flanking sequence	
<b>ACAUGC</b>	<i>AGUUCGCUU...</i>	Frequency	<b>ACAUAC</b>	<i>AGUUCGCUU...</i>	Frequency
<b>ACAUGC</b>		1/23	<b>ACAUAC</b>		5/20
<b>ACAUGC</b>	<i>A</i>	6/23	<b>ACAUAC</b>	<i><u>A</u></i>	3/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AA</u></i>	1/23	<b>ACAUAC</b>	<i><u>AAAA</u></i>	1/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AAA</u></i>	1/23	<b>ACAUAC</b>	<i>AG</i>	3/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGAAA</u></i>	3/23	<b>ACAUAC</b>	<i><u>AGAA</u></i>	1/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGUA</u></i>	2/23	<b>ACAUAC</b>	<i><u>AGAAA</u></i>	1/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGUUA</u></i>	1/23	<b>ACAUAC</b>	<i><u>AGUA</u></i>	1/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGUUAAAA</u></i>	1/23	<b>ACAUAC</b>	<i><u>AGUUA</u></i>	2/20
<b>ACAUGC</b>	<i>AGUUC</i>	1/23	<b>ACAUAC</b>	<i>AGUUC</i>	1/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGUUCGA</u></i>	1/23	<b>ACAUAC</b>	<i><u>AGUUCGCU</u></i>	1/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGUUCGCU</u></i>	2/23	<b>ACAUAC</b>	<i><u>AGUUCGCUU</u></i>	1/20
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGUUCGCUAA</u></i>	1/23			
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGUUCGCUU</u></i>	1/23			
<b>ACAUGC</b>	<i><u>AGUUCGCUUA</u></i>	1/23			

The last six residues at the 3'-end of mature hTR are shown for both constructs, with the ACA box in bold letters. The adjacent 3' flanking sequence of the precursor is in italics. The frequencies of cloned sequences obtained by 3' RLM-RACE are indicated. The nucleotides that do not correspond to the 3' flanking sequence are in bold letters and underlined.

**Tableau 4.2:** 3'-end of endogenous hTR transcripts processed in HeLa and BeWo cells.

HeLa			BeWo		
Mature 3'-end	3' flanking sequence		Mature 3'-end	3' flanking sequence	
ACAUGC	<i>AGUUCGCUU...</i>	Frequency	ACAUGC	<i>AGUUCGCUU...</i>	Frequency
ACAUGC		12/18	ACAUGC		21/26
ACAUGC	<i>A</i>	3/18	ACAUGC	<i>A</i>	1/26
ACAUGC	<i>AG</i>	1/18	ACAUGC	<i>AA</i>	1/26
ACAUGC	<i>AG<u>AAAAA</u></i>	1/18	ACAUGC	<i>AGU<u>A</u></i>	1/26
ACAUGC	<i><u>AAAAAA</u></i>	1/18	ACAUGC	<i><u>AAAAA</u></i>	1/26
			ACAUGC	<i><u>AAAAG</u></i>	1/26

The last six residues at the 3'-end of mature hTR are shown for both cell lines, with the ACA box in bold letters. The adjacent 3' flanking sequence of the precursor is in italics. The frequencies of cloned sequences obtained by 3' RLM-RACE are indicated. The nucleotides that do not correspond to the 3' flanking sequence are in bold letters and underlined.

#### 4.8 Figure legends

**Figure 1:** Schematic representation of the H/ACA-like domain of hTR. The **top image** illustrates a fragment (nucleotides 204 to 451) that encompasses the H/ACA-like domain of wild-type hTR (WT). The conserved motifs H (AGAGGA) and ACA, located three nucleotides from the 3'-end, are also shown (boxed sequences). The 3'-flanking nucleotides of the primary transcript are in italics. **Bottom image** (G450A) shows the alternative box ACA created by the G450A mutation in hTR, which could lead to accumulation of hTR molecules that are four nucleotides longer than WT.

**Figure 2:** Mutation of the ACA motif generates hTR molecules with variable 3'-ends. Box H and the ACA motif variant (A446G) are shown (boxed sequences). The residues located at the 3'-end of various hTR molecules identified by 3' RLM-RACE are presented. The frequency of clones identified more than once is indicated.



4.9 Figures

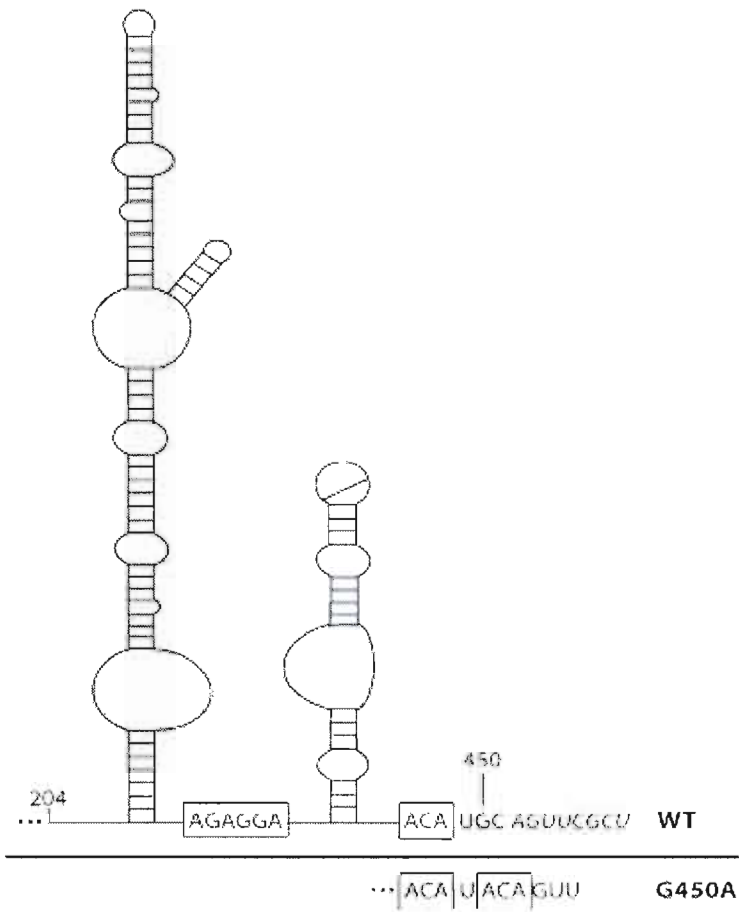


Figure 4.1

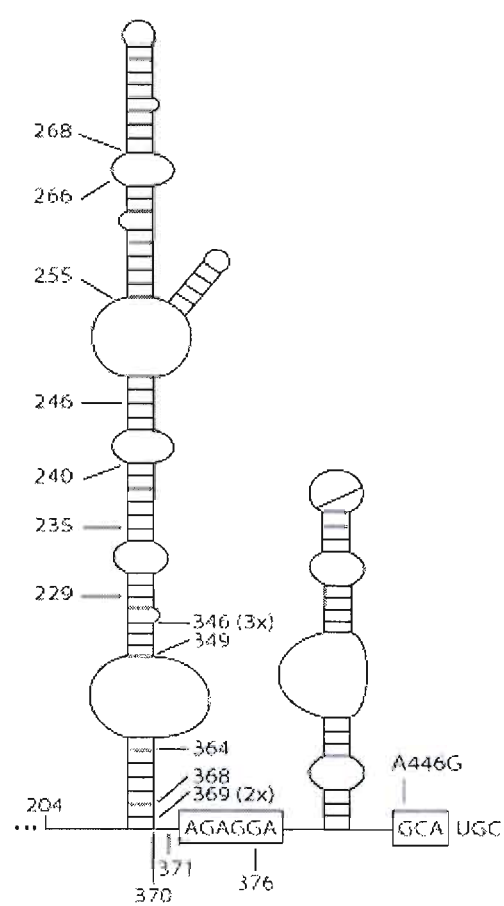


Figure 4.2

## CHAPITRE V

### DISCUSSION

#### 5.1 Système de reconstitution *in vitro*

L'objectif principal de cette thèse était d'analyser l'effet de mutations associées à la DC dans le domaine H/ACA de hTR ainsi que dans les protéines dyskérine, NHP2 et NOP10 sur la biogenèse de RNP H/ACA. Comme l'assemblage de précurseurs ribonucléoprotéiques avec les ARN H/ACA nouvellement synthétisés est une étape initiale dans la biogénèse de RNP H/ACA, nous avons choisi d'analyser la formation de ces pré-RNP. Pour ce faire, nous avons élaboré un système *in vitro* qui nous a permis de rapidement évaluer l'effet d'une panoplie de mutations sur l'assemblage du tétramère NAF1-dyskérine-NOP10-NHP2 avec un fragment contenant le domaine H/ACA de hTR (hTR204) ainsi que d'autres ARN H/ACA. L'assemblage des pré-RNP H/ACA est toutefois plus complexe *in vivo*, et d'autres facteurs sont probablement impliqués. L'utilisation de lysat de réticulocytes de lapin (RRL) comporte certainement des avantages dans notre système de reconstitution *in vitro*. Tout comme l'humain, le lapin est un vertébré et l'ARN de la télomérase de lapin contient également un domaine H/ACA. Nous savons que le RRL contient des protéines H/ACA endogènes et il est possible que l'assemblage du tétramère avec un ARN H/ACA synthétique, que nous appelons pré-RNP dans nos études, soit médié par certaines protéines endogènes au RRL. Des pré-RNP H/ACA peuvent tout de même être reconstituées dans ce système, et nous avons démontré que l'assemblage de ces dernières est spécifique (Trahan et Dragon 2009). Ceci suggère que si des facteurs endogènes au RRL sont requis pour la formation de pré-RNP, le RRL contient suffisamment de ces facteurs pour en assurer un assemblage constant.

Bien que le trimère dyskérine-NOP10-NHP2 soit le complexe protéique minimal capable de lier efficacement hTR et les autres ARN H/ACA en général (Wang et Meier 2004; Trahan et Dragon 2009), nous avons démontré que NAF1 doit interagir avec ce trimère afin

d'être efficacement intégrée aux pré-RNP H/ACA (Trahan et Dragon 2009). Comme chacune des protéines du trimère mentionné ci-haut, NAF1 est essentielle à l'accumulation de hTR et des ARN H/ACA *in vivo* (Fu et Collins 2007; Hoareau-Aveilla, Bonoli *et al.* 2006). NAF1 est donc le meilleur candidat protéique à cibler lors des l'analyses de pré-RNP H/ACA par immunoprécipitation (Trahan et Dragon 2009; Trahan, Martel et Dragon 2010). Nous avons cependant trouvé un ARN H/ACA qui fait exception au pré-requis de NAF1 dans l'assemblage de pré-RNP. En effet, U17, le seul snoRNA H/ACA impliqué dans des clivages de pré-rRNA (Atzorn, Fragapane et Kiss 2004), peut être assemblé efficacement avec NAF1 en l'absence du trimère dyskérine-NOP10-NHP2 dans le RRL. Nous ne savons toutefois pas si NAF1 seule peut interagir directement avec U17 ou si des protéines endogènes au RRL rendent cette interaction possible en absence du trimère. Afin de contourner ce problème lors de l'analyse de formation de pré-RNP avec U17 dans le contexte de mutations dans la dyskérine, NOP10 et NHP2, nous avons utilisé le trimère dyskérine-NOP10-NHP2 en absence de NAF1 et nous avons procédé à des immunoprécipitations de NOP10 au lieu de NAF1.

Le système *in vitro* que nous avons développé nous a permis de mettre en évidence d'importants défauts d'assemblage du domaine H/ACA de hTR en pré-RNP engendrés par la mutation C408G et la délétion  $\Delta 378-451$  reliées à des formes dominantes de la DC (Trahan et Dragon 2009). Notre système *in vitro* nous a également permis de révéler que la mutation la plus fréquente (A353V), qui est localisée dans le domaine PUA de la dyskérine, cause spécifiquement un défaut modéré d'assemblage du domaine H/ACA de la télomérase (Trahan, Martel et Dragon 2010). Le fait que le mutant A353V de la dyskérine influence spécifiquement l'assemblage de pré-RNP avec le domaine H/ACA de hTR suggère que les interactions entre hTR et le domaine PUA de la dyskérine sont différentes de celles impliquées entre U64, U92 et U17 et le dit domaine PUA. Ce domaine pourrait donc servir d'adaptateur multiple dans l'assemblage de différentes RNP H/ACA. L'analyse des trois mutations récessives liées à la DC dans NHP2 démontre que les mutations V126M et Y139H ont un effet négatif sur la liaison de NHP2 à NOP10. Cette perte de liaison entre NOP10 et NHP2 cause par conséquent un important défaut d'assemblage de pré-RNP avec la plupart des ARN H/ACA. Finalement, nous démontrons que la seule mutation récessive associée à la

DC dans NOP10 (R34W) n'a aucune influence sur la formation du tétramère protéique. Nos résultats indiquent toutefois que cette arginine est cruciale pour l'assemblage de pré-RNP avec des ARN H/ACA standards, alors qu'elle n'est pas requise pour l'assemblage de pré-RNP avec des ARN H/ACA qui encodent des miRNA (Trahan, Martel et Dragon 2010). Ces résultats impliquent qu'il y a des différences d'assemblage entre les ARN H/ACA qui hébergent des miRNA et ceux qui n'en contiennent pas.

Même s'il n'existe aucune preuve directe, l'abrogation de la formation de pré-RNP *in vivo* engendre fort probablement la dégradation rapide des transcrits H/ACA non-assemblés. Cette supposition est supportée par le fait qu'une mutation dans la boîte ACA de hTR (A446G) abolit la formation de pré-RNP avec le domaine H/ACA de hTR (Trahan et Dragon 2009). De plus, aucun transcrit mature de ce mutant exprimé à partir d'un plasmide dans des cellules VA-13 n'a pu être détecté par 3' RLM-RACE (Chapitre IV). Dans un système similaire, Fu et Collins (2003) ont également montré que tous les éléments nécessaires à la maturation de l'extrémité 3' de hTR sont contenus dans son domaine H/ACA, ce qui suggère que l'assemblage de ce domaine en pré-RNP est essentiel à sa maturation. Fu et Collins (2003) ont également montré qu'une substitution de la boîte ACA de hTR par UGU cause la perte d'accumulation de hTR. Les boîtes ACA des ARN H/ACA interagissent vraisemblablement avec le domaine PUA de la dyskérine comme c'est le cas chez l'archéobactérie (Li et Ye 2006). La boîte ACA constituerait donc un élément essentiel à l'assemblage de pré-RNP H/ACA, et la formation de pré-RNP protégerait l'ARN de la dégradation. Il y a donc de fortes chances que les mutations impliquées dans la DC qui abrogent la formation de pré-RNP dans notre système de reconstitution *in vitro* (Trahan et Dragon 2009; Trahan, Martel et Dragon 2010) engendrent les mêmes effets *in vivo*, ce qui causerait la dégradation des transcrits affectés.

## 5.2 Implications pour la dyskératose congénitale

La DC est autant hétérogène au niveau génétique qu'au niveau clinique. De par la nature des cinq protéines dont les mutations sont directement associées à la DC, il y a lieu de croire que les manifestations de la maladie sont principalement causées par des défauts dans la

biologie de la télomérase, ou dans la maintenance des télomères. Des télomères extrêmement courts sont effectivement un élément communément observé chez les sujets atteints, ce qui renforce le lien entre la DC et la biologie des télomères (Kirwan et Dokal 2008). Cependant, en plus de former une RNP avec le domaine H/ACA de hTR, les protéines dyskérine, NHP2 et NOP10 sont également au cœur de la biologie des snoRNP et scaRNP H/ACA. Les sno/scaRNP guident respectivement la pseudouridylation de rRNA et de snRNA, et la pseudouridylation de ces derniers semble importante pour leurs stabilités et leurs fonctions (Ge, Rudnick *et al.* ; Gu, Zhao *et al.* 2009; King, Liu *et al.* 2003; Liang, Liu et Fournier 2009; Matera, Terns et Terns 2007; Yu, Shu et Steitz 1998; Zhao et Yu 2004).

Alors que la perte d'assemblage de pré-RNP avec le domaine H/ACA de hTR causée par la mutation C408G et la délétion  $\Delta 378-451$  conduit probablement à la dégradation spécifique des transcrits de hTR non assemblés *in vivo*, des mutations dans NOP10 et NHP2 empêchent également la formation de différentes populations de pré-RNP H/ACA, en plus de l'assemblage du domaine H/ACA de la télomérase. En effet, les mutations V126M et Y139H dans NHP2 semblent affecter la majorité des RNP H/ACA (incluant ceux qui encodent des miRNA), alors que la mutation R34W dans NOP10 semble épargner spécifiquement l'assemblage d'ARN H/ACA qui hébergent des miRNA, et n'affecterait que ceux qui n'en hébergent pas. Si de telles RNP H/ACA sont assemblées avec NOP10-R34W et que des miRNA actifs en sont générés *in vivo*, connaître leurs cibles pourrait aider à identifier les différentes voies moléculaires affectées par les mutants V126M et Y139H de NHP2 qui semblent abolir l'assemblage en pré-RNP de la majorité des ARN H/ACA, incluant ceux qui hébergent des miRNA. Bien que les cibles des miRNA présents dans ACA36B et U92 ne sont pas encore identifiées, le miRNA dérivé du scaRNA ACA45 module la traduction du mRNA codant pour la protéine CDC2L6 ("cell division cycle 2-like 6") (Ender, Krek *et al.* 2008). Cette protéine est un modulateur de l'épissage (Loyer, Trembley *et al.* 2008), de l'apoptose (Yun, Wu *et al.* 2007), et est également une composante du complexe Médiateur qui fonctionne dans l'activation de la transcription (Conaway, Sato *et al.* 2005). L'effet qu'ont ces deux mutations dans NHP2 dans l'assemblage de pré-RNP avec hTR et les autres ARN H/ACA en général pourraient donc avoir plus de conséquences au niveau cellulaire comparativement à la mutation R34W dans NOP10.

Curieusement, de toutes les mutations analysées dans la dyskérine, seule la mutation A353V cause spécifiquement un défaut modéré de l'assemblage en pré-RNP du domaine H/ACA de hTR, et aucune des mutations ne semble affecter la formation de pré-RNP avec les autres ARN H/ACA analysés. hTR serait donc plus sensible à cette mutation que les autres ARN H/ACA. Il est curieux de noter que l'acide aminé équivalent à A353 dans la levure (Cbf5p) soit une valine, et que selon une étude, hTR exprimé dans la levure peut s'associer à Cbf5p ainsi que les autres protéines communes aux RNP H/ACA matures (Dez, Henras *et al.* 2001). Il est possible que certaines interactions entre Cbf5p et les ARN H/ACA de la levure et même entre dyskérine et certains (ou la majorité) des ARN H/ACA des vertébrés, diffèrent légèrement de celles entre hTR et la dyskérine. Cela supporterait l'idée d'une fonction d'adaptateur multiple pour le domaine PUA de la dyskérine. Il ne faut pas oublier que l'ARN de la télomérase de levure comme celui de tous les invertébrés ne contient pas de domaine H/ACA, et qu'il y a certaines différences évolutives entre la Cbf5p de levure et la dyskérine des vertébrés. Par exemple, la dyskérine chez l'humain possède de légères extensions en N et C-terminal comparé à Cbf5p (Figure 1.12), et ces extensions pourraient également jouer un rôle dans l'assemblage spécifique de certains ARN H/ACA comme hTR. Finalement comme l'efficacité d'assemblage de hTR avec les protéines H/ACA de la levure n'a pas été effectuée parallèlement à celle du mutant A353V de la dyskérine d'humain dans notre système, ou même la comparaison de l'accumulation de ces RNP *in vivo* entre les deux espèces, il demeure difficile de réconcilier notre étude (Chapitre 3) à l'étude de Dez, Henras *et al.* (2001).

Il a été démontré dans des cellules souches embryonnaire murines que la mutation A353V de la dyskérine cause une réduction marquée du niveau de mTR, en plus d'une diminution moins marquée du niveau de certains snoRNA H/ACA (majoritairement mE2, mE3 et mU70, ainsi qu'une très légère baisse de mU64) (Mochizuki, He *et al.* 2004). Une diminution du mRNA et de la protéine dyskérine dans ces cellules ES furent également observés, et il est possible que les niveaux cellulaires de la dyskérine-A353V ne suffisent pas à supporter un assemblage soutenu du domaine H/ACA de mTR *in vivo*. Cela pourrait expliquer en partie la forte réduction de mTR dans des cellules ES murines, comparée à la

réduction modérée de pré-RNP du domaine H/ACA de hTR dans le contexte d'une mutation A353V dans la dyskérine *in vitro*.

Contrairement à Mochizuki *et al.* (2004), nous n'avons pas observé de diminution de formation de pré-RNP formées avec U64, et nous avons démontré que l'assemblage de la pré-RNP E2 s'effectue de manière distincte de toutes les RNP H/ACA assemblées dans notre système de reconstitution (Trahan, Martel et Dragon 2010). Il serait donc intéressant de comparer l'assemblage de pré-RNP de type sauvage avec les ARN H/ACA E3 et U70, qui sont modulés par la mutation A353V dans la dyskérine chez la souris, avec l'assemblage en pré-RNP de hTR204. Il est possible que E2, E3 et U70 fassent partie d'un sous-groupe d'ARN H/ACA dont l'assemblage s'effectue de façon particulière, ce qui pourrait expliquer que ce sous-groupe d'ARN H/ACA soit particulièrement touché par la mutation A353V *in vivo*. Il serait également intéressant de tester l'effet de cette mutation sur l'assemblage de pré-RNP avec E3 et U70 qui sont modulés dans les cellules ES murines. Même si l'assemblage de pré-RNP s'avérait peu efficace avec E3 et U70, il serait peut-être possible d'observer un effet causé par la mutation A353V comme nous l'avons fait lors de l'assemblage de pré-RNP avec E2 et le mutant R34W de NOP10 (Trahan, Martel et Dragon 2010).

Récemment, la protéine SHQ1 fut identifiée comme une protéine impliquée dans le transport de la dyskérine du cytoplasme vers le noyau, mais qui ne fait pas partie des pré-RNP assemblées. SHQ1 est un facteur précoce d'assemblage dans la biogenèse de RNP H/ACA et elle est essentielle à l'accumulation d'ARN H/ACA (Grozdanov, roy *et al.* 2009; Yang, Rotondo *et al.* 2002). Il fut démontré que certaines mutations associées à la DC dans l'orthologue de la dyskérine de rat (NAP57) peuvent affecter l'affinité de NAP57 envers SHQ1 (Grozdanov, Fernandez-Fuentes *et al.* 2009). Grozdanov, Fernandez-Fuentes et collaborateurs (2009) proposent que la modulation de l'affinité entre NAP57 et SHQ1 influence le bassin cellulaire de la dyskérine destiné à l'assemblage de pré-RNP. Le RRL contenant probablement un certain niveau de SHQ1 endogène, ceci pourrait expliquer la diminution d'assemblage de pré-RNP avec hTR et le mutant A353V de la dyskérine. Il est quand même curieux que cette diminution d'assemblage en pré-RNP soit spécifique à hTR étant donné que SHQ1 est essentielle à l'accumulation d'ARN H/ACA en général.



Mis à part le mutant A353V, nous observons tout de même une légère variabilité dans la formation de pré-RNP avec les mutants de dyskérine (Chapitre II) qui est difficilement quantifiable dans notre système de reconstitution *in vitro*. Si ces mutations dans la dyskérine modulent son affinité envers SHQ1, il semblerait que cet effet soit léger dans l'assemblage de pré-RNP (Grozdanov, Fernandez-Fuentes *et al.* 2009) et causeraient donc probablement des défauts plus importants lors d'étapes ultérieures à l'assemblage de pré-RNP.

De la même façon, la mutation X154R dans NHP2 et les mutations dans la dyskérine qui n'ont pas d'effet apparent sur l'assemblage de pré-RNP avec le domaine H/ACA de hTR et les autres ARN H/ACA dans notre système, perturbent probablement la biologie de la télomérase et possiblement de certaines RNP H/ACA à une étape ultérieure à l'assemblage de pré-RNP.

Comme l'assemblage de pré-RNP est médié par plusieurs interactions entre chacune des composantes de la pré-RNP, il est possible que des défauts subtils dans les interactions ARN-protéine soient tolérés dans notre système de reconstitution, produisant ainsi des pré-RNP complètes mais incorrectement assemblées. Par exemple, il serait possible que des mutations engendrent un mauvais repliement de certaines régions protéiques, ou que certaines interactions protéines-protéines / protéine-ARN soient perdues, mais que la somme des interactions soit suffisante pour médier un assemblage complet de pré-RNP. Afin d'exclure cette possibilité, il faudrait appliquer des méthodes d'empreinte protéique et d'empreinte d'ARN aux pré-RNP assemblées avec ces mutants et comparer les résultats avec ceux obtenus avec des pré-RNP de type sauvage. De tels défauts pourraient avoir des conséquences plus sérieuses *in vivo*. Par exemple, il existe probablement des points de contrôle de l'assemblage de RNP H/ACA *in vivo*, ce qui pourrait engendrer la destruction des RNP ayant subi un assemblage erroné.

Aucun défaut d'assemblage en pré-RNP H/ACA n'a été détecté avec la dyskérine comportant une délétion des 22 derniers acides aminés de l'extrémité C-terminale ( $\Delta 22C$ ). Gu, Bessler et Mason (2008) ont cependant démontré dans un système murin que la délétion

de l'exon 15 qui correspond à une délétion de 21 résidus à l'extrémité C-terminale de la dyskérine murine provoque une diminution de mTR, du rRNA 28S associée à une accumulation de pré-rRNA, ainsi qu'une baisse marquée de l'abondance de U64, un guide de pseudouridylation du rRNA 28S. Ils démontrent que cette délétion induit un désavantage prolifératif qui est dépendant de la télomérase et que les cellules contenant cette délétion affichent une sensibilité accrue de la réponse au dommage de l'ADN télomérique via la voie ATM/p53 (Gu, Bessler et Mason 2009). Par conséquent, des mutations associées à la DC dans les trois protéines H/ACA peuvent également altérer la biogénèse de snoRNA et de scaRNA H/ACA, ce qui semble avoir des impacts sur les voies de synthèse des rRNA, de composantes de la machinerie d'épissage (snRNA), et possiblement de la biogénèse de certains miRNA selon le cas, en plus de la biogénèse ou le maintien des télomères. Tout cela suggère donc que certains désordres de la DC causés par des mutations dans la dyskérine, NOP10 et NHP2 pourraient être spécifiques non seulement à la télomérase, mais également à certaines RNP H/ACA ou encore à des voies régulées par les miRNA encodés dans certains de ces derniers.

Plusieurs études suggèrent que la télomérase dimérise ou multimérise *in vitro* et *in vivo* (Arai, Masutomi *et al.* 2002; Beattie, Zhou *et al.* 2001; Cohen, Graham *et al.* 2007; Ly, Xu *et al.* 2003; Moriarty, Marie-Egyptienne et Autexier 2004; Ren, Gavory *et al.* 2003; Wenz, Enenkel *et al.* 2001). Il fut récemment démontré qu'un mutant dominant négatif de TERT est exporté au cytoplasme avant d'être ubiquitylé et dégradé. La coexpression de ce mutant avec TERT de type sauvage cause une diminution des niveaux de TERT de type sauvage probablement via une multimérisation avec le mutant dominant négatif, et le complexe serait dégradé dans le cytoplasme (Nguyen, Elmore et Holt 2009). Il est donc possible que le mutant NHP2-X154R ainsi que les mutants de dyskérine qui ne semblent pas affecter l'assemblage de pré-RNP puissent provoquer de la même façon, la dégradation d'une portion du bassin de la télomérase normale contribuant à l'attrition des télomères. Il serait important de savoir si les mutants de la dyskérine en général, ainsi que le mutant X154R peuvent activer la voie de p53 menant à l'arrêt du cycle cellulaire indépendamment de la longueur des télomères de la même façon que la dyskérine comportant une délétion en C-terminal.

### 5.3 Mise à profit du système de reconstitution de pré-RNP

Le système de reconstitution et d'analyse de RNP élaboré *in vitro* pourrait être fort utile pour tenter de déterminer avec plus d'exactitude ce qu'est le domaine H/ACA de hTR. Selon certains, il comprend les deux tiges-boucles de la moitié 3' de hTR à l'exception des régions conservées CR4-5, alors que pour d'autres, le domaine H/ACA de hTR ne s'étend que de la boîte H jusqu'à l'extrémité 3' de l'ARN (Figure 1.10) (Antal, Boros *et al.* 2002; Chen, Blasco et Greider 2000; Chen et Greider 2004; Fu et Collins 2003; Jady, Bertrand et Kiss 2004; Mitchell, Cheng et Collins 1999). La perte de formation de pré-RNP avec le mutant hTR  $\Delta 378-451$  qui se termine avec la boîte H suggère que la tige-boucle 5' du domaine H/ACA de hTR ne peut être efficacement assemblée avec le tétramère. D'un autre côté, il est possible que l'assemblage de la tige-boucle 3' soit requis pour l'assemblage de la tige-boucle 5' du domaine H/ACA. Les plus anciens ARN H/ACA sont retrouvés chez les archéobactéries. Ils comportent majoritairement une seule tige-boucle suivie d'une boîte ACA et ils sont dépourvus de boîte H. Contrairement aux archéobactéries, les ARN H/ACA eucaryotiques sont majoritairement constitués de deux tiges-boucles, séparées par une boîte H (ANANNA; où N est variable). D'un point de vue évolutif, il serait donc possible que la boîte H constitue une variation de la boîte ACA suivie de NNN ayant moins d'affinité pour le PUA de la dyskérine, et que l'assemblage des deux tiges-boucles se fasse d'une manière coopérative plutôt qu'indépendante. Il y aurait donc lieu de tester l'assemblage de pré-RNP avec un dérivé de hTR $\Delta 378-451$  dans lequel la boîte H serait substituée par la boîte ACA en plus des trois nucléotides terminaux de hTR (AGAGGA $\rightarrow$ ACAUGC). Si des RNP peuvent être assemblées dans un tel contexte, il serait alors possible de procéder à des délétions progressives à partir de l'extrémité de la tige-boucle 5' et d'évaluer leur effet sur l'assemblage de RNP. L'utilisation de sélection *in vitro* (SELEX; «Systematic Evolution of Ligands by Exponential enrichment») pourrait également être utile dans notre système *in vitro* de reconstitution de pré-RNP pour déterminer avec plus d'exactitude ce qu'est le domaine H/ACA de hTR.

Il serait intéressant d'analyser l'effet des autres délétions et substitutions présentes dans le domaine H/ACA de hTR qui sont associées à des désordres (voir Figure 1.10) et qui n'ont pas été testées sur l'assemblage de pré-RNP. La reconstitution de pré-RNP avec hTR

comportant une délétion 216-229 reliée à la DC pourrait également fournir des renseignements sur l'assemblage de la tige-boucle 5' du domaine H/ACA de hTR. Bien que la mutation G450A reliée à l'anémie aplasique ne cause pas de défaut apparent d'assemblage de RNP, il est possible qu'il en soit autrement pour la délétion 341-361 reliée à des désordres hépatiques et la délétion 389-390 reliée à la thrombocytose essentielle.

Comme le PUA de la dyskérine semble agir comme adaptateur multiple dans l'assemblage de RNP H/ACA, il serait également intéressant de tester toutes les mutations du domaine PUA qui sont impliquées dans la DC sur l'assemblage de nombreuses pré-RNP H/ACA. Peut-être que différentes mutations associées à la DC dans le domaine PUA de la dyskérine affectent l'assemblage de différents ARN H/ACA en RNP, ce qui supporterait l'hypothèse d'une fonction d'adaptateur multiple du domaine PUA de la dyskérine.

Étant donné que la mutation R34W dans NOP10 ne semble pas affecter la formation de pré-RNP avec les ARN H/ACA qui hébergent des miRNA, il serait important d'analyser le seul ARN H/ACA qui encode un miRNA dont la cible est connue (ACA45) dans notre système de reconstitution afin d'établir un lien plus concret entre les mutations V126M et Y139H dans NHP2 et la régulation de l'épissage, de la transcription et de l'apoptose par ACA45.

Il serait utile de pouvoir automatiser la méthode de reconstitution et d'analyse de pré-RNP afin de pouvoir procéder à l'analyse de tous les ARN H/ACA connus. Un tel système permettrait de repérer rapidement les ARN H/ACA dont l'assemblage en RNP est perturbé par chacune des mutations liées à la DC dans la dyskérine, NOP10 et NHP2. Il serait alors plus facile de valider les résultats *in vivo*, ainsi que de détecter les ARN H/ACA qui ont un assemblage atypique, comme E2 par exemple. Un système d'analyse automatisé permettrait également de pouvoir tester de nombreuses molécules thérapeutiques pour chacun des défauts engendrés par les mutations A353V de la dyskérine, V126M et Y139H dans NHP2 et R34W dans NOP10, dans le but de trouver des molécules qui rétablissent l'assemblage de pré-RNP avec ces mutants.

#### 5.4 Transposition de nos études de reconstitution *in vivo*

Le caractère transitoire de ces pré-RNP rend leur étude difficile à réaliser *in vivo*. Difficile, mais pas impossible. L'utilisation de cellules de patients atteints de la maladie peut comporter certains désavantages dans de telles analyses. Comme les mutations dans le domaine H/ACA de hTR sont dominantes, le bruit de fond causé par l'allèle normal de l'individu pourrait rendre l'analyse de ces pré-RNP plus alambiquée. Il faudrait également trouver des cellules homozygotes pour chacune des mutations récessives à analyser afin de pouvoir associer chacune des mutations à un seul phénotype, ce qui n'est pas possible pour certaines mutations comme les mutations V126M et X154R dans NHP2 par exemple (Trahan, Martel et Dragon 2010). Pour contourner le problème dans le cas des mutations dans la dyskérine, il faudrait trouver des cellules d'individus mâles, qui n'ont donc qu'un chromosome X et un seul allèle *DKC1*. Il serait également possible d'utiliser des cellules d'individus homozygotes pour les mutations Y139H dans NHP2 et R34W dans NOP10. L'analyse de la formation de pré-RNP pourrait être effectuée par immunoprécipitation de protéine liant l'ARN suivi d'un «microarray» (RIP-Chip) ou suivi d'un séquençage direct des ARN (RIP-seq). Pour y parvenir, il faudrait trouver ou produire des anticorps qui fonctionnent en immunoprécipitation et / ou en immunobuvardage pour chacune des composantes protéiques à analyser, une tâche qui pourrait se révéler non banale. Afin de ne pas avoir à trouver des anticorps qui fonctionnent en immunobuvardage, il serait possible d'utiliser la spectrométrie de masse (MS) pour analyser les complexes protéiques isolés par RIP.

Alternativement, il serait possible de procéder à l'analyse de pré-RNP formées avec les mutants du domaine H/ACA de hTR dans des cellules "hTR négatives", comme la lignée cellulaire VA-13, qui serait supplémentée avec des plasmides codant pour hTR ou ses dérivés. La formation de pré-RNP pourrait également être effectuée par les méthodes décrites ci-haut.

Pour l'analyse de la formation de pré-RNP H/ACA dans le contexte de mutations dans la dyskérine et NHP2, l'utilisation d'une lignée cellulaire "hTR positive" serait plus appropriée que la lignée VA-13. En supplémentant cette lignée avec un plasmide codant pour une protéine mutante fusionnée à un épitope 3X-FLAG par exemple, et en inhibant la synthèse de

la protéine endogène de type sauvage avec des siRNA ciblant le 3'-UTR du transcrit, il serait possible d'analyser l'assemblage de pré-RNP pour chacune des mutations par RIP-Chip / RIP-seq / RIP-MS (via le 3X-FLAG). Finalement, comme la plupart des mutations dans la dyskérine, ainsi que la mutation X154R dans NHP2, n'affectent pas l'assemblage de pré-RNP dans notre système *in vitro*, il serait intéressant de vérifier si des RNP matures sont formées avec ces mutants *in vivo*. En utilisant le même système que pour les mutants qui abrogent la formation de RNP, il serait possible de procéder à l'immunoprécipitation de chacune des protéines via l'épitope 3X-FLAG, et d'analyser la présence de NAF1 (RNP immature) ou GAR1 (RNP mature) dans les immunoprécipités par immunobuvardage. Les ARN H/ACA co-immunoprécipités pourraient être analysés par RT-PCR, «microarray», par hybridation Northern ou même par séquençage directe des ARN. Si des RNP matures sont formées avec ces mutants, il serait alors possible d'analyser l'activité de pseudouridylation de RNP matures immunoprécipitées en utilisant des ARN cibles synthétiques tel que décrit ailleurs dans la littérature (Wang, Query et Meier 2002). Dans le cas de la mutation R34W dans NOP10, un système similaire pourrait être utilisé, dans lequel il serait également possible d'analyser par hybridation Northern si des miRNA matures sont générés à partir d'ARN H/ACA qui les encode comparativement à leur production dans des cellules de type sauvage. Il serait également possible de quantifier ces miRNA générés à partir d'ARN H/ACA qui les encode par la méthode de ligation par attelle «splint ligation» (Maroney, Chamnongpol *et al.* 2007). Une telle analyse pourrait en même temps indiquer si l'assemblage de RNP H/ACA contenant des miRNA est nécessaire à la production de ces miRNA, ou si les deux processus sont indépendants.

Pour analyser l'effet de la mutation R34W sur l'assemblage de RNP, il serait cependant plus facile de vérifier si les ARN H/ACA qui hébergent des miRNA sont maturés *in vivo* et si des miRNA en sont générés en utilisant des cellules de patient homozygotes pour la mutation R34W dans NOP10. Il serait possible de comparer les résultats avec ceux obtenus avec des cellules du patient homozygote pour la mutation Y139H dans NHP2 ainsi qu'avec des résultats de cellules normales contrôles.

## 5.5 Fonction de l'oligoadénylation

L'oligoadénylation de molécules de hTR presque matures *in vivo* (Chapitre IV) n'est probablement pas un artéfact causé par la méthode, car aucun fragment oligoadénylé du mutant de la boîte ACA de hTR ne fut amplifié par RLM-RACE. Tel que mentionné précédemment, le transcrit du mutant de la boîte ACA ne peut former de pré-RNP (Chapitre II) et est fort probablement dégradé rapidement *in vivo*. Cela expliquerait l'absence de transcrits matures et la présence de produits de dégradation de hTR pour ce mutant *in vivo*. Si l'oligoadénylation de hTR avait été un artéfact causé par la méthode, des transcrits oligoadénylés de ce mutant auraient dû être amplifiés. Cependant nous ne savons pas si l'oligoadénylation de hTR est un processus normal de maturation de son extrémité 3', ou si elle joue plutôt un rôle dans la dégradation de certains transcrits de hTR. Il serait alors primordial de comparer la stabilité de transcrits maturés oligoadénylés à ceux qui ne le sont pas. Pour ce faire on pourrait transfecter des ARN synthétiques (Chapitre IV, Tableau 4.2) marqués au P-32 dans des cellules VA-13 et déterminer la demie vie des ARN transfectés. Cela permettrait d'avoir une meilleure idée de la fonction de l'oligoadénylation.

Étant donné que l'assemblage en RNP du domaine H/ACA de hTR est essentiel à la maturation de son extrémité 3' (Fu et Collins 2003), purifier et enrichir les protéines associées à l'oligoadénylation de molécules presque matures de hTR (Chapitre IV) pourrait s'avérer un défi de taille. Afin de tenter d'enrichir ces facteurs, il serait possible d'utiliser différents ARN synthétiques correspondants au domaine H/ACA de hTR fusionnés aux séquences 3' oligoadénylées de hTR (Chapitre IV, Tableau 4.2). La fusion de deux petites tiges-boucles reconnaissant spécifiquement la protéine MS2 en 5' des ARN synthétiques permettrait de tenter de purifier les RNP formées par affinité en utilisant la protéine MS2 couplée à des billes d'agarose (Batey et Kieft 2007). En incubant ces ARN hybrides synthétiques avec des extraits nucléaires de trophoblastes ou de cellules HeLa, ou en les transfectant dans ces dernières, il serait peut-être possible d'enrichir et d'identifier des candidats par spectrométrie de masse. Alternativement, les ARN synthétiques pourraient être fixés aux billes agarose-MS2 et les RNP assemblées directement sur les billes. Dans le cas où la purification d'affinité MS2 s'avérerait insuffisante, les RNP purifiées par affinité MS2 pourraient être éluées avec un excès de tiges-boucles MS2, et les éluats pourraient être

d'avantage enrichis en pré-RNP par l'immunopurification de NAF1. L'analyse spectrométrique des protéines enrichies avec des ARN dont la longueur d'oligoadénylation varie de une à six adénine pourrait également être comparée. Les candidats pourront alors être vérifiés et confirmés *in vivo* en transfectant les cellules avec des siRNA dirigés contre les mRNA des protéines candidates, et en procédant par la suite au 3' RLM-RACE de hTR pour vérifier l'état d'oligoadénylation de hTR.

## 5.6 Transcrit primaire de hTR et éléments de maturation

Malgré la sensibilité du 3' RLM-RACE, nous ne sommes pas arrivés à détecter de précurseurs d'environ 1000 nt ou plus tel que rapporté par Fu et Collins (2003). Lors de tentatives d'amplifier des précurseurs de hTR, la taille des fragments obtenus par 3' RLM-RACE mesurant plus de 1000 nt se sont avérés être des amplifications non-spécifiques. Ceci suggère que soit le transcrit primaire de hTR mesure plus de 3 kpb (taille maximale des fragments amplifiés par RLM-RACE selon le plus long temps d'élongation testé lors des PCR), ou soit le traitement rapide des précurseurs combiné à la faible abondance de ces derniers situe leurs niveaux en dessous du seuil de détection du 3' RLM-RACE.

Il semblerait néanmoins qu'un ou des éléments situés à plus de 500 pb en aval de la séquence codante de hTR contribue à l'efficacité de maturation de l'extrémité 3' de hTR, ce qui suggère également que le transcrit primaire de hTR mesure plus de 1000 nt. Afin de déterminer où sont localisés ces éléments, des constructions contenant hTR et des fragments de taille croissante de la séquence 3' flanquante de hTR pourraient être transfectées dans des cellules VA-13, et l'efficacité de maturation serait analysée par 3' RLM-RACE. En comparant les résultats obtenus à ceux obtenus dans les cellules HeLa et Bewo, il serait alors possible de localiser la ou les régions hébergeant cet ou ces éléments. Des mutations/délétions de cette ou ces régions seraient alors nécessaires afin de confirmer l'identité des dits éléments.



## CONCLUSION GÉNÉRALE

Mes travaux m'auront tout d'abord permis de contribuer à une meilleure compréhension de la participation de chacune des protéines H/ACA communes aux pré-RNP H/ACA dans la formation de ces complexes immatures, une des étapes initiales dans la biogenèse de RNP H/ACA. Le système *in vitro* élaboré pour ce faire m'a également permis d'évaluer les conséquences de l'introduction de mutations liées à la DC dans le domaine H/ACA de hTR, ainsi que dans les protéines dyskérine, NOP10 et NHP2 sur l'assemblage de ces complexes précurseurs. Ainsi, pour chacun des composants H/ACA reliés à la DC qui fut testé, j'ai pu mettre en évidence des défauts d'assemblage de pré-RNP H/ACA incluant celles formées avec le domaine H/ACA de hTR. Mes études apportent également de nouvelles informations concernant les différentes populations de RNP H/ACA affectées par les différents composants H/ACA reliés à la DC. L'hypothèse que les transcrits H/ACA naissants, incluant celui de hTR, sont rapidement dégradés *in vivo* en absence de formation de pré-RNP H/ACA est supportée par l'étude de la maturation 3' de hTR (Chapitre 4). Tout en soulevant plusieurs nouvelles questions qui sont discutées dans cette section, mes études (Chapitres 2 et 3) ouvrent maintenant la voie au criblage de petites molécules afin de trouver des molécules qui rétablissent l'assemblage de pré-RNP affectées par des mutations associées à la DC, incluant l'assemblage de la télomérase en pré-RNP H/ACA. La découverte de telles molécules pourrait aboutir à une thérapie personnalisée de la DC en fonction des composants mutés et des mutations contenues dans ces derniers.

## RÉFÉRENCES

- Amiri, K. A. 1994. «Fibrillarin-like proteins occur in the domain Archaea». *J Bacteriol*, Vol. 176, n°7, p. 2124-2127.
- Antal, M., E. Boros, F. Solymosy et T. Kiss. 2002. «Analysis of the structure of human telomerase RNA in vivo». *Nucleic Acids Res*, Vol. 30, n°4, p. 912-920.
- Arai, K., K. Masutomi, S. Khurts, S. Kaneko, K. Kobayashi et S. Murakami. 2002. «Two independent regions of human telomerase reverse transcriptase are important for its oligomerization and telomerase activity». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°10, p. 8538-8544.
- Aravind, L. et E. V. Koonin. 1999. «Novel predicted RNA-binding domains associated with the translation machinery». *J Mol Evol*, Vol. 48, n°3, p. 291-302.
- Aris, J. P. et G. Blobel. 1991. «cDNA cloning and sequencing of human fibrillarin, a conserved nucleolar protein recognized by autoimmune antisera». *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 88, n°3, p. 931-935.
- Atzorn, V., P. Fragapane et T. Kiss. 2004. «U17/snR30 is a ubiquitous snoRNA with two conserved sequence motifs essential for 18S rRNA production». *Mol Cell Biol*, Vol. 24, n°4, p. 1769-1778.
- Auld, D. S. 2001. «Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites». *Biometals*, Vol. 14, n°3-4, p. 271-313.
- Autexier, C. 2008. «POT of gold: modeling dyskeratosis congenita in the mouse». *Genes Dev*, Vol. 22, n°13, p. 1731-1736.
- Autexier, C., R. Pruzan, W. D. Funk et C. W. Greider. 1996. «Reconstitution of human telomerase activity and identification of a minimal functional region of the human telomerase RNA». *EMBO J*, Vol. 15, n°21, p. 5928-5935.
- Baccon, J., L. Pellizzoni, J. Rappsilber, M. Mann et G. Dreyfuss. 2002. «Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°35, p. 31957-31962.
- Bachand, F., F. M. Boisvert, J. Cote, S. Richard et C. Autexier. 2002. «The product of the survival of motor neuron (SMN) gene is a human telomerase-associated protein». *Mol Biol Cell*, Vol. 13, n°9, p. 3192-3202.
- Bachellerie, J. P., J. Cavaillé et A. Hüttenhofer. 2002. «The expanding snoRNA world». *Biochimie*, Vol. 84, n°8, p. 775-790.

- Baek, S. H. 2008. «When ATPases pontin and reptin met telomerase». *Dev Cell*, Vol. 14, n°4, p. 459-461.
- Bagni, C. et B. Lapeyre. 1998. «Gar1p binds to the small nucleolar RNAs snR10 and snR30 in vitro through a nontypical RNA binding element». *J Biol Chem*, Vol. 273, n°18, p. 10868-10873.
- Baird, D. M., J. Rowson, D. Wynford-Thomas et D. Kipling. 2003. «Extensive allelic variation and ultrashort telomeres in senescent human cells». *Nat Genet*, Vol. 33, n°2, p. 203-207.
- Baker, D. L., N. T. Seyfried, H. Li, R. Orlando, R. M. Terns et M. P. Terns. 2008. «Determination of protein-RNA interaction sites in the Cbf5-H/ACA guide RNA complex by mass spectrometric protein footprinting». *Biochemistry*, Vol. 47, n°6, p. 1500-1510.
- Baker, D. L., O. A. Youssef, M. I. Chastkofsky, D. A. Dy, R. M. Terns et M. P. Terns. 2005. «RNA-guided RNA modification: functional organization of the archaeal H/ACA RNP». *Genes Dev*, Vol. 19, n°10, p. 1238-1248.
- Balakin, A. G., L. Smith et M. J. Fournier. 1996. «The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions». *Cell*, Vol. 86, n°5, p. 823-834.
- Ballarino, M., M. Morlando, F. Pagano, A. Fatica et I. Bozzoni. 2005. «The cotranscriptional assembly of snoRNPs controls the biosynthesis of H/ACA snoRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell Biol*, Vol. 25, n°13, p. 5396-5403.
- Banik, S. S. et C. M. Counter. 2004. «Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR». *J Biol Chem*, Vol. 279, n°50, p. 51745-51748.
- Bartel, D. P. 2004. «MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function». *Cell*, Vol. 116, n°2, p. 281-297.
- Baserga, S. J., X. D. Yang et J. A. Steitz. 1991. «An intact Box C sequence in the U3 snRNA is required for binding of fibrillarin, the protein common to the major family of nucleolar snRNPs». *EMBO J*, Vol. 10, n°9, p. 2645-2651.
- Bateman, A. et V. Kickhoefer. 2003. «The TROVE module: a common element in Telomerase, Ro and Vault ribonucleoproteins». *BMC Bioinformatics*, Vol. 4, p. 49.
- Batey, R. T. et J. S. Kieft. 2007. «Improved native affinity purification of RNA». *RNA*, Vol. 13, n°8, p. 1384-1389.

- Beattie, T. L., W. Zhou, M. O. Robinson et L. Harrington. 2001. «Functional multimerization of the human telomerase reverse transcriptase». *Mol Cell Biol*, Vol. 21, n°18, p. 6151-6160.
- Berger, W., E. Steiner, M. Grusch, L. Elbling et M. Micksche. 2009. «Vaults and the major vault protein: novel roles in signal pathway regulation and immunity». *Cell Mol Life Sci*, Vol. 66, n°1, p. 43-61.
- Bianchi, A. et T. de Lange. 1999. «Ku binds telomeric DNA in vitro». *J Biol Chem*, Vol. 274, n°30, p. 21223-21227.
- Blasco, M. A., H. W. Lee, M. P. Hande, E. Samper, P. M. Lansdorp, R. A. DePinho et C. W. Greider. 1997. «Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA». *Cell*, Vol. 91, n°1, p. 25-34.
- Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner et W. E. Wright. 1998. «Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells». *Science*, Vol. 279, n°5349, p. 349-352.
- Bortolin, M. L., J. P. Bachellerie et B. Clouet-d'Orval. 2003. «In vitro RNP assembly and methylation guide activity of an unusual box C/D RNA, cis-acting archaeal pre-tRNA(Trp)». *Nucleic Acids Res*, Vol. 31, n°22, p. 6524-6535.
- Bortolin, M. L., P. Ganot et T. Kiss. 1999. «Elements essential for accumulation and function of small nucleolar RNAs directing site-specific pseudouridylation of ribosomal RNAs». *EMBO J*, Vol. 18, n°2, p. 457-469.
- Bousquet-Antonelli, C., Y. Henry, J. P. G'Elugne, M. Caizergues-Ferrer et T. Kiss. 1997. «A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs». *EMBO J*, Vol. 16, n°15, p. 4770-4776.
- Branscombe, T. L., A. Frankel, J. H. Lee, J. R. Cook, Z. Yang, S. Pestka et S. Clarke. 2001. «PRMT5 (Janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins». *J Biol Chem*, Vol. 276, n°35, p. 32971-32976.
- Cahill, N. M., K. Friend, W. Speckmann, Z. H. Li, R. M. Terns, M. P. Terns et J. A. Steitz. 2002. «Site-specific cross-linking analyses reveal an asymmetric protein distribution for a box C/D snoRNP». *EMBO J*, Vol. 21, n°14, p. 3816-3828.
- Calado, R. T., J. A. Regal, D. E. Kleiner, D. S. Schrupp, N. R. Peterson, V. Pons, S. J. Chanock, P. M. Lansdorp et N. S. Young. 2009. «A spectrum of severe familial liver disorders associate with telomerase mutations». *PLoS One*, Vol. 4, n°11, p. e7926.

- Capper, R., B. Britt-Compton, M. Tankimanova, J. Rowson, B. Letsolo, S. Man, M. Haughton et D. M. Baird. 2007. «The nature of telomere fusion and a definition of the critical telomere length in human cells». *Genes Dev*, Vol. 21, n°19, p. 2495-2508.
- Carissimi, C., L. Saieva, J. Baccon, P. Chiarella, A. Maiolica, A. Sawyer, J. Rappsilber et L. Pellizzoni. 2006. «Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly». *J Biol Chem*, Vol. 281, n°12, p. 8126-8134.
- Cavaillé, J., A. A. Hadjiolov et J. P. Bachellerie. 1996. «Processing of mammalian rRNA precursors at the 3' end of 18S rRNA. Identification of cis-acting signals suggests the involvement of U13 small nucleolar RNA». *Eur J Biochem*, Vol. 242, n°2, p. 206-213.
- Chai, W., L. P. Ford, L. Lenertz, W. E. Wright et J. W. Shay. 2002. «Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°49, p. 47242-47247.
- Chambers, J. C. et J. D. Keene. 1985. «Isolation and analysis of cDNA clones expressing human lupus La antigen». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 82, n°7, p. 2115-2119.
- Charpentier, B., S. Muller et C. Branlant. 2005. «Reconstitution of archaeal H/ACA small ribonucleoprotein complexes active in pseudouridylation». *Nucleic Acids Res*, Vol. 33, n°10, p. 3133-3144.
- Charroux, B., L. Pellizzoni, R. A. Perkinson, A. Shevchenko, M. Mann et G. Dreyfuss. 1999. «Gemin3: A novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular atrophy gene product, and is a component of gems». *J Cell Biol*, Vol. 147, n°6, p. 1181-1194.
- Charroux, B., L. Pellizzoni, R. A. Perkinson, J. Yong, A. Shevchenko, M. Mann et G. Dreyfuss. 2000. «Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli». *J Cell Biol*, Vol. 148, n°6, p. 1177-1186.
- Chen, J. L., M. A. Blasco et C. W. Greider. 2000. «Secondary structure of vertebrate telomerase RNA». *Cell*, Vol. 100, n°5, p. 503-514.
- Chen, J. L. et C. W. Greider. 2004. «Telomerase RNA structure and function: implications for dyskeratosis congenita». *Trends Biochem Sci*, Vol. 29, n°4, p. 183-192.
- Chen, J. L., K. K. Opperman et C. W. Greider. 2002. «A critical stem-loop structure in the CR4-CR5 domain of mammalian telomerase RNA». *Nucleic Acids Res*, Vol. 30, n°2, p. 592-597.
- Chiang, Y. J., M. T. Hemann, K. S. Hathcock, L. Tessarollo, L. Feigenbaum, W. C. Hahn et R. J. Hodes. 2004. «Expression of telomerase RNA template, but not telomerase

- reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo». *Mol Cell Biol*, Vol. 24, n°16, p. 7024-7031.
- Chin, K., C. O. de Solorzano, D. Knowles, A. Jones, W. Chou, E. G. Rodriguez, W. L. Kuo, B. M. Ljung, K. Chew, K. Myambo, M. Miranda, S. Krig, J. Garbe, M. Stampfer, P. Yaswen, J. W. Gray et S. J. Lockett. 2004. «In situ analyses of genome instability in breast cancer». *Nat Genet*, Vol. 36, n°9, p. 984-988.
- Cioce, M. et A. I. Lamond. 2005. «Cajal bodies: a long history of discovery». *Annu Rev Cell Dev Biol*, Vol. 21, p. 105-131.
- Cohen, S. B., M. E. Graham, G. O. Lovrecz, N. Bache, P. J. Robinson et R. R. Reddel. 2007. «Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells». *Science*, Vol. 315, n°5820, p. 1850-1853.
- Collado, M., M. A. Blasco et M. Serrano. 2007. «Cellular senescence in cancer and aging». *Cell*, Vol. 130, n°2, p. 223-233.
- Collins, K. 2006. «The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes». *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 7, n°7, p. 484-494.
- Collins, K. 2008. «Physiological assembly and activity of human telomerase complexes». *Mech Ageing Dev*, Vol. 129, n°1-2, p. 91-98.
- Conaway, R. C., S. Sato, C. Tomomori-Sato, T. Yao et J. W. Conaway. 2005. «The mammalian Mediator complex and its role in transcriptional regulation». *Trends Biochem Sci*, Vol. 30, n°5, p. 250-255.
- Counter, C. M., A. A. Avilion, C. E. LeFeuvre, N. G. Stewart, C. W. Greider, C. B. Harley et S. Bacchetti. 1992. «Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity». *EMBO J*, Vol. 11, n°5, p. 1921-1929.
- d'Adda di Fagagna, F., P. M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N. P. Carter et S. P. Jackson. 2003. «A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence». *Nature*, Vol. 426, n°6963, p. 194-198.
- d'Adda di Fagagna, F., S. H. Teo et S. P. Jackson. 2004. «Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response». *Genes Dev*, Vol. 18, n°15, p. 1781-1799.
- Darzacq, X., B. E. Jady, C. Verheggen, A. M. Kiss, E. Bertrand et T. Kiss. 2002. «Cajal body-specific small nuclear RNAs: a novel class of 2'-O-methylation and pseudouridylation guide RNAs». *EMBO J*, Vol. 21, n°11, p. 2746-2756.
- Darzacq, X. et T. Kiss. 2000. «Processing of intron-encoded box C/D small nucleolar RNAs lacking a 5',3'-terminal stem structure». *Mol Cell Biol*, Vol. 20, n°13, p. 4522-4531.

- Darzacq, X., N. Kittur, S. Roy, Y. Shav-Tal, R. H. Singer et U. T. Meier. 2006. «Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells». *J Cell Biol*, Vol. 173, n°2, p. 207-218.
- de Lange, T., L. Shiue, R. M. Myers, D. R. Cox, S. L. Naylor, A. M. Killery et H. E. Varmus. 1990. «Structure and variability of human chromosome ends». *Mol Cell Biol*, Vol. 10, n°2, p. 518-527.
- Denchi, E. L. et T. de Lange. 2007. «Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1». *Nature*, Vol. 448, n°7157, p. 1068-1071.
- Dennis, P. P. et A. Omer. 2005. «Small non-coding RNAs in Archaea». *Curr Opin Microbiol*, Vol. 8, n°6, p. 685-694.
- Dez, C., A. Henras, B. Faucon, D. Lafontaine, M. Caizergues-Ferrer et Y. Henry. 2001. «Stable expression in yeast of the mature form of human telomerase RNA depends on its association with the box H/ACA small nucleolar RNP proteins Cbf5p, Nhp2p and Nop10p». *Nucleic Acids Res*, Vol. 29, n°3, p. 598-603.
- Dez, C., J. Noaillac-Depeyre, M. Caizergues-Ferrer et Y. Henry. 2002. «Naf1p, an essential nucleoplasmic factor specifically required for accumulation of box H/ACA small nucleolar RNPs». *Mol Cell Biol*, Vol. 22, n°20, p. 7053-7065.
- Do, C. B., M. S. Mahabhashyam, M. Brudno et S. Batzoglou. 2005. «ProbCons: Probabilistic consistency-based multiple sequence alignment». *Genome Res*, Vol. 15, n°2, p. 330-340.
- Dragon, F., V. Lemay et C. Trahan (2006). «snoRNAs: Biogenesis Structure and Function». *Encyclopedia of Life Sciences*, John Wiley & Sons, Ltd. <http://www.els.net/>.
- Dragon, F., V. Pogacic et W. Filipowicz. 2000. «In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs». *Mol Cell Biol*, Vol. 20, n°9, p. 3037-3048.
- Ender, C., A. Krek, M. R. Friedlander, M. Beitzinger, L. Weinmann, W. Chen, S. Pfeffer, N. Rajewsky et G. Meister. 2008. «A human snoRNA with microRNA-like functions». *Mol Cell*, Vol. 32, n°4, p. 519-528.
- Enright, C. A., E. S. Maxwell, G. L. Eliceiri et B. Sollner-Webb. 1996. «5'ETS rRNA processing facilitated by four small RNAs: U14, E3, U17, and U3». *RNA*, Vol. 2, n°11, p. 1094-1099.
- Farr, C., J. Fantes, P. Goodfellow et H. Cooke. 1991. «Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 88, n°16, p. 7006-7010.

- Fatica, A., M. Dlakic et D. Tollervy. 2002. «Naf1 p is a box H/ACA snoRNP assembly factor». *RNA*, Vol. 8, n°12, p. 1502-1514.
- Feng, J., W. D. Funk, S. S. Wang, S. L. Weinrich, A. A. Avilion, C. P. Chiu, R. R. Adams, E. Chang, R. C. Allsopp, J. Yu et a. l. et. 1995. «The RNA component of human telomerase». *Science*, Vol. 269, n°5228, p. 1236-1241.
- Filipowicz, W. et V. Pogacic. 2002. «Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins». *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 14, n°3, p. 319-327.
- Finkel, T., M. Serrano et M. A. Blasco. 2007. «The common biology of cancer and ageing». *Nature*, Vol. 448, n°7155, p. 767-774.
- Fischer, U., Q. Liu et G. Dreyfuss. 1997. «The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis». *Cell*, Vol. 90, n°6, p. 1023-1029.
- Fiset, S. et B. Chabot. 2001. «hnRNP A1 may interact simultaneously with telomeric DNA and the human telomerase RNA in vitro». *Nucleic Acids Res*, Vol. 29, n°11, p. 2268-2275.
- Ford, L. P., J. W. Shay et W. E. Wright. 2001. «The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo». *RNA*, Vol. 7, n°8, p. 1068-1075.
- Ford, L. P., J. M. Suh, W. E. Wright et J. W. Shay. 2000. «Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2 associate with the RNA component of human telomerase». *Mol Cell Biol*, Vol. 20, n°23, p. 9084-9091.
- Ford, L. P., W. E. Wright et J. W. Shay. 2002. «A model for heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in telomere and telomerase regulation». *Oncogene*, Vol. 21, n°4, p. 580-583.
- Friesen, W. J. et G. Dreyfuss. 2000. «Specific sequences of the Sm and Sm-like (Lsm) proteins mediate their interaction with the spinal muscular atrophy disease gene product (SMN)». *J Biol Chem*, Vol. 275, n°34, p. 26370-26375.
- Friesen, W. J., S. Massenet, S. Paushkin, A. Wyce et G. Dreyfuss. 2001. «SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets». *Mol Cell*, Vol. 7, n°5, p. 1111-1117.
- Friesen, W. J., S. Paushkin, A. Wyce, S. Massenet, G. S. Pesiridis, G. Van Duyne, J. Rappsilber, M. Mann et G. Dreyfuss. 2001. «The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins». *Mol Cell Biol*, Vol. 21, n°24, p. 8289-8300.



- Friesen, W. J., A. Wyce, S. Paushkin, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann et G. Dreyfuss. 2002. «A novel WD repeat protein component of the methylosome binds Sm proteins». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°10, p. 8243-8247.
- Fu, D. et K. Collins. 2003. «Distinct biogenesis pathways for human telomerase RNA and H/ACA small nucleolar RNAs». *Mol Cell*, Vol. 11, n°5, p. 1361-1372.
- Fu, D. et K. Collins. 2006. «Human telomerase and Cajal body ribonucleoproteins share a unique specificity of Sm protein association». *Genes Dev*, Vol. 20, n°5, p. 531-536.
- Fu, D. et K. Collins. 2007. «Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation». *Mol Cell*, Vol. 28, n°5, p. 773-785.
- Ganot, P., M. L. Bortolin et T. Kiss. 1997. «Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs». *Cell*, Vol. 89, n°5, p. 799-809.
- Ganot, P., M. Caizergues-Ferrer et T. Kiss. 1997. «The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation». *Genes Dev*, Vol. 11, n°7, p. 941-956.
- Garcia, C. K., W. E. Wright et J. W. Shay. 2007. «Human diseases of telomerase dysfunction: insights into tissue aging». *Nucleic Acids Res*, Vol. 35, n°22, p. 7406-7416.
- Gaspin, C., J. Cavaillé, G. Erauso et J. P. Bachellerie. 2000. «Archaeal homologs of eukaryotic methylation guide small nucleolar RNAs: lessons from the *Pyrococcus* genomes». *J Mol Biol*, Vol. 297, n°4, p. 895-906.
- Gautier, T., T. Berges, D. Tollervy et E. Hurt. 1997. «Nucleolar KKE/D repeat proteins Nop56p and Nop58p interact with Nop1p and are required for ribosome biogenesis». *Mol Cell Biol*, Vol. 17, n°12, p. 7088-7098.
- Ge, J., D. A. Rudnick, J. He, D. L. Crimmins, J. H. Ladenson, M. Bessler et P. J. Mason. «Dyskerin ablation in mouse liver inhibits rRNA processing and cell division». *Mol Cell Biol*, Vol. 30, n°2, p. 413-422.
- Ge, J., D. A. Rudnick, J. He, D. L. Crimmins, J. H. Ladenson, M. Bessler et P. J. Mason. 2009. «Dyskerin ablation in mouse liver inhibits ribosomal RNA processing and cell division». *Mol Cell Biol*, p.
- Gilley, D., H. Tanaka, M. P. Hande, A. Kurimasa, G. C. Li, M. Oshimura et D. J. Chen. 2001. «DNA-PKcs is critical for telomere capping». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 98, n°26, p. 15084-15088.

- Gilson, E. et V. Geli. 2007. «How telomeres are replicated». *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 8, n°10, p. 825-838.
- Girard, J. P., C. Bagni, M. Caizergues-Ferrer, F. Amalric et B. Lapeyre. 1994. «Identification of a segment of the small nucleolar ribonucleoprotein-associated protein GAR1 that is sufficient for nucleolar accumulation». *J Biol Chem*, Vol. 269, n°28, p. 18499-18506.
- Girard, J. P., M. Caizergues-Ferrer et B. Lapeyre. 1993. «The SpGAR1 gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes the functional homologue of the snoRNP protein GAR1 of *Saccharomyces cerevisiae*». *Nucleic Acids Res*, Vol. 21, n°9, p. 2149-2155.
- Girard, J. P., H. Lehtonen, M. Caizergues-Ferrer, F. Amalric, D. Tollervy et B. Lapeyre. 1992. «GAR1 is an essential small nucleolar RNP protein required for pre-rRNA processing in yeast». *EMBO J*, Vol. 11, n°2, p. 673-682.
- Glazov, E. A., K. Kongsuwan, W. Assavalapsakul, P. F. Horwood, N. Mitter et T. J. Mahony. 2009. «Repertoire of bovine miRNA and miRNA-like small regulatory RNAs expressed upon viral infection». *PLoS One*, Vol. 4, n°7, p. e6349.
- Golembe, T. J., J. Yong et G. Dreyfuss. 2005. «Specific sequence features, recognized by the SMN complex, identify snRNAs and determine their fate as snRNPs». *Mol Cell Biol*, Vol. 25, n°24, p. 10989-11004.
- Goytisolo, F. A., E. Samper, S. Edmonson, G. E. Taccioli et M. A. Blasco. 2001. «The absence of the dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang». *Mol Cell Biol*, Vol. 21, n°11, p. 3642-3651.
- Greider, C. W., E. H. Blackburn. 1996. «Telomeres, telomerase and cancer». *Sci Am*, Vol. 2, p.92-97.
- Griffith, J. D., L. Comeau, S. Rosenfield, R. M. Stansel, A. Bianchi, H. Moss et T. de Lange. 1999. «Mammalian telomeres end in a large duplex loop». *Cell*, Vol. 97, n°4, p. 503-514.
- Grozdanov, P. N., N. Fernandez-Fuentes, A. Fiser et U. T. Meier. 2009. «Pathogenic NAP57 mutations decrease ribonucleoprotein assembly in dyskeratosis congenita». *Hum Mol Genet*, Vol. 18, n°23, p. 4546-4551.
- Grozdanov, P. N., S. Roy, N. Kittur et U. T. Meier. 2009. «SHQ1 is required prior to NAF1 for assembly of H/ACA small nucleolar and telomerase RNPs». *RNA*, Vol. 15, n°6, p. 1188-1197.

- Grzechnik, P. et J. Kufel. 2008. «Polyadenylation linked to transcription termination directs the processing of snoRNA precursors in yeast». *Mol Cell*, Vol. 32, n°2, p. 247-258.
- Gu, B., M. Bessler et P. J. Mason. 2009. «Dyskerin, telomerase and the DNA damage response». *Cell Cycle*, Vol. 8, n°1, p. 6-10.
- Gu, B. W., M. Bessler et P. J. Mason. 2008. «A pathogenic dyskerin mutation impairs proliferation and activates a DNA damage response independent of telomere length in mice». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 105, n°29, p. 10173-10178.
- Gu, B. W., C. Zhao, J. M. Fan, Q. Dai, M. Bessler et P. J. Mason. 2009. «Anomalous electrophoretic migration of newly synthesized ribosomal RNAs and their precursors from cells with DKC1 mutations». *FEBS Lett*, Vol. 583, n°18, p. 3086-3090.
- Gubitz, A. K., Z. Mourelatos, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann et G. Dreyfuss. 2002. «Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°7, p. 5631-5636.
- Guglielmi, B. et M. Werner. 2002. «The yeast homolog of human PinX1 is involved in rRNA and small nucleolar RNA maturation, not in telomere elongation inhibition». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°38, p. 35712-35719.
- Guo, X., Y. Deng, Y. Lin, W. Cosme-Blanco, S. Chan, H. He, G. Yuan, E. J. Brown et S. Chang. 2007. «Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis». *EMBO J*, Vol. 26, n°22, p. 4709-4719.
- Gustafsson, C., R. Reid, P. J. Greene et D. V. Santi. 1996. «Identification of new RNA modifying enzymes by iterative genome search using known modifying enzymes as probes». *Nucleic Acids Res*, Vol. 24, n°19, p. 3756-3762.
- Hamma, T. et A. R. Ferre-D'Amare. 2004. «Structure of protein L7Ae bound to a K-turn derived from an archaeal box H/ACA sRNA at 1.8 Å resolution». *Structure*, Vol. 12, n°5, p. 893-903.
- Hamma, T., S. L. Reichow, G. Varani et A. R. Ferre-D'Amare. 2005. «The Cbf5-Nop10 complex is a molecular bracket that organizes box H/ACA RNPs». *Nat Struct Mol Biol*, Vol. 12, n°12, p. 1101-1107.
- Hanish, J. P., J. L. Yanowitz et T. de Lange. 1994. «Stringent sequence requirements for the formation of human telomeres». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 91, n°19, p. 8861-8865.
- Harley, C. B., A. B. Futcher et C. W. Greider. 1990. «Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts». *Nature*, Vol. 345, n°6274, p. 458-460.

- Hastie, N. D., M. Dempster, M. G. Dunlop, A. M. Thompson, D. K. Green et R. C. Allshire. 1990. «Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing». *Nature*, Vol. 346, n°6287, p. 866-868.
- Hayflick, L. et P. S. Moorhead. 1961. «The serial cultivation of human diploid cell strains». *Exp Cell Res*, Vol. 25, p. 585-621.
- He, J., S. Navarrete, M. Jasinski, T. Vulliamy, I. Dokal, M. Bessler et P. J. Mason. 2002. «Targeted disruption of Dkc1, the gene mutated in X-linked dyskeratosis congenita, causes embryonic lethality in mice». *Oncogene*, Vol. 21, n°50, p. 7740-7744.
- Heiss, N. S., A. Girod, R. Salowsky, S. Wiemann, R. Pepperkok et A. Poustka. 1999. «Dyskerin localizes to the nucleolus and its mislocalization is unlikely to play a role in the pathogenesis of dyskeratosis congenita». *Hum Mol Genet*, Vol. 8, n°13, p. 2515-2524.
- Heiss, N. S., S. W. Knight, T. J. Vulliamy, S. M. Klauck, S. Wiemann, P. J. Mason, A. Poustka et I. Dokal. 1998. «X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions». *Nat Genet*, Vol. 19, n°1, p. 32-38.
- Henras, A., C. Dez, J. Noaillac-Depeyre, Y. Henry et M. Caizergues-Ferrer. 2001. «Accumulation of H/ACA snoRNPs depends on the integrity of the conserved central domain of the RNA-binding protein Nhp2p». *Nucleic Acids Res*, Vol. 29, n°13, p. 2733-2746.
- Henras, A., Y. Henry, C. Bousquet-Antonelli, J. Noaillac-Depeyre, J. P. Gelugne et M. Caizergues-Ferrer. 1998. «Nhp2p and Nop10p are essential for the function of H/ACA snoRNPs». *EMBO J*, Vol. 17, n°23, p. 7078-7090.
- Henras, A. K., R. Capeyrou, Y. Henry et M. Caizergues-Ferrer. 2004. «Cbf5p, the putative pseudouridine synthase of H/ACA-type snoRNPs, can form a complex with Gar1p and Nop10p in absence of Nhp2p and box H/ACA snoRNAs». *RNA*, Vol. 10, n°11, p. 1704-1712.
- Henras, A. K., C. Dez et Y. Henry. 2004. «RNA structure and function in C/D and H/ACA s(no)RNPs». *Curr Opin Struct Biol*, Vol. 14, n°3, p. 335-343.
- Herbig, U., W. A. Jobling, B. P. Chen, D. J. Chen et J. M. Sedivy. 2004. «Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)». *Mol Cell*, Vol. 14, n°4, p. 501-513.
- Higuchi, R., B. Krummel et R. K. Saiki. 1988. «A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments: study of protein and DNA interactions». *Nucleic Acids Res*, Vol. 16, n°15, p. 7351-7367.

- Hiley, S. L., T. Babak et T. R. Hughes. 2005. «Global analysis of yeast RNA processing identifies new targets of RNase III and uncovers a link between tRNA 5' end processing and tRNA splicing». *Nucleic Acids Res*, Vol. 33, n°9, p. 3048-3056.
- Hinkley, C. S., M. A. Blasco, W. D. Funk, J. Feng, B. Villeponteau, C. W. Greider et W. Herr. 1998. «The mouse telomerase RNA 5'-end lies just upstream of the telomerase template sequence». *Nucleic Acids Res*, Vol. 26, n°2, p. 532-536.
- Hirose, T., T. Ideue, M. Nagai, M. Hagiwara, M. D. Shu et J. A. Steitz. 2006. «A spliceosomal intron binding protein, IBP160, links position-dependent assembly of intron-encoded box C/D snoRNP to pre-mRNA splicing». *Mol Cell*, Vol. 23, n°5, p. 673-684.
- Hirose, T., M. D. Shu et J. A. Steitz. 2003. «Splicing-dependent and -independent modes of assembly for intron-encoded box C/D snoRNPs in mammalian cells». *Mol Cell*, Vol. 12, n°1, p. 113-123.
- Hirose, T. et J. A. Steitz. 2001. «Position within the host intron is critical for efficient processing of box C/D snoRNAs in mammalian cells». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 98, n°23, p. 12914-12919.
- Hoang, C. et A. R. Ferre-D'Amare. 2001. «Cocrystal structure of a tRNA Psi55 pseudouridine synthase: nucleotide flipping by an RNA-modifying enzyme». *Cell*, Vol. 107, n°7, p. 929-939.
- Hoareau-Aveilla, C., M. Bonoli, M. Caizergues-Ferrer et Y. Henry. 2006. «hNaf1 is required for accumulation of human box H/ACA snoRNPs, scaRNPs, and telomerase». *RNA*, Vol. 12, n°5, p. 832-840.
- Hockemeyer, D., W. Palm, R. C. Wang, S. S. Couto et T. de Lange. 2008. «Engineered telomere degradation models dyskeratosis congenita». *Genes Dev*, Vol. 22, n°13, p. 1773-1785.
- Hsu, H. L., D. Gilley, S. A. Galande, M. P. Hande, B. Allen, S. H. Kim, G. C. Li, J. Campisi, T. Kohwi-Shigematsu et D. J. Chen. 2000. «Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining». *Genes Dev*, Vol. 14, n°22, p. 2807-2812.
- He, H., Y. Wang, X. Guo, S. Ramchandani, J. Ma, M. F. Shen, D. A. Garcia, Y. Deng, A. S. Multani, M. J. You et S. Chang. 2009. «Pot1b deletion and telomerase haploinsufficiency in mice initiate an ATR-dependent DNA damage response and elicit phenotypes resembling dyskeratosis congenita».
- Hughes, J. M. et M. Ares, Jr. 1991. «Depletion of U3 small nucleolar RNA inhibits cleavage in the 5' external transcribed spacer of yeast pre-ribosomal RNA and impairs formation of 18S ribosomal RNA». *EMBO J*, Vol. 10, n°13, p. 4231-4239.

- Hüttenhofer, A., M. Kiefmann, S. Meier-Ewert, J. O'Brien, H. Lehrach, J. P. Bachellerie et J. Brosius. 2001. «RNomics: an experimental approach that identifies 201 candidates for novel, small, non-messenger RNAs in mouse». *EMBO J*, Vol. 20, n°11, p. 2943-2953.
- Isaac, C., Y. Yang et U. T. Meier. 1998. «Nopp140 functions as a molecular link between the nucleolus and the coiled bodies». *J Cell Biol*, Vol. 142, n°2, p. 319-329.
- Jady, B. E., E. Bertrand et T. Kiss. 2004. «Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal». *J Cell Biol*, Vol. 164, n°5, p. 647-652.
- Jady, B. E., X. Darzacq, K. E. Tucker, A. G. Matera, E. Bertrand et T. Kiss. 2003. «Modification of Sm small nuclear RNAs occurs in the nucleoplasmic Cajal body following import from the cytoplasm». *EMBO J*, Vol. 22, n°8, p. 1878-1888.
- Jady, B. E. et T. Kiss. 2001. «A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA». *EMBO J*, Vol. 20, n°3, p. 541-551.
- Jiang, W., K. Middleton, H. J. Yoon, C. Fouquet et J. Carbon. 1993. «An essential yeast protein, CBF5p, binds in vitro to centromeres and microtubules». *Mol Cell Biol*, Vol. 13, n°8, p. 4884-4893.
- Jones, K. W., K. Gorzynski, C. M. Hales, U. Fischer, F. Badbanchi, R. M. Terns et M. P. Terns. 2001. «Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin». *J Biol Chem*, Vol. 276, n°42, p. 38645-38651.
- Karpusas, M., M. Nolte, C. B. Benton, W. Meier, W. N. Lipscomb et S. Goelz. 1997. «The crystal structure of human interferon beta at 2.2-A resolution». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 94, n°22, p. 11813-11818.
- Kass, S., K. Tyc, J. A. Steitz et B. Sollner-Webb. 1990. «The U3 small nucleolar ribonucleoprotein functions in the first step of preribosomal RNA processing». *Cell*, Vol. 60, n°6, p. 897-908.
- Kedersha, N. L. et L. H. Rome. 1986. «Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: large structures contain a single species of small RNA». *J Cell Biol*, Vol. 103, n°3, p. 699-709.
- Keys, B., V. Serra, G. Saretzki et T. Von Zglinicki. 2004. «Telomere shortening in human fibroblasts is not dependent on the size of the telomeric-3'-overhang». *Aging Cell*, Vol. 3, n°3, p. 103-109.

- Khanna, M., H. Wu, C. Johansson, M. Caizergues-Ferrer et J. Feigon. 2006. «Structural study of the H/ACA snoRNP components Nop10p and the 3' hairpin of U65 snoRNA». *RNA*, Vol. 12, n°1, p. 40-52.
- Kickhoefer, V. A., M. J. Poderycki, E. K. Chan et L. H. Rome. 2002. «The La RNA-binding protein interacts with the vault RNA and is a vault-associated protein». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°43, p. 41282-41286.
- Kickhoefer, V. A., R. P. Searles, N. L. Kedersha, M. E. Garber, D. L. Johnson et L. H. Rome. 1993. «Vault ribonucleoprotein particles from rat and bullfrog contain a related small RNA that is transcribed by RNA polymerase III». *J Biol Chem*, Vol. 268, n°11, p. 7868-7873.
- Kickhoefer, V. A., A. C. Siva, N. L. Kedersha, E. M. Inman, C. Ruland, M. Streuli et L. H. Rome. 1999. «The 193-kD vault protein, VPARP, is a novel poly(ADP-ribose) polymerase». *J Cell Biol*, Vol. 146, n°5, p. 917-928.
- Kickhoefer, V. A., A. G. Stephen, L. Harrington, M. O. Robinson et L. H. Rome. 1999. «Vaults and telomerase share a common subunit, TEP1». *J Biol Chem*, Vol. 274, n°46, p. 32712-32717.
- King, T. H., W. A. Decatur, E. Bertrand, E. S. Maxwell et M. J. Fournier. 2001. «A well-connected and conserved nucleoplasmic helicase is required for production of box C/D and H/ACA snoRNAs and localization of snoRNP proteins». *Mol Cell Biol*, Vol. 21, n°22, p. 7731-7746.
- King, T. H., B. Liu, R. R. McCully et M. J. Fournier. 2003. «Ribosome structure and activity are altered in cells lacking snoRNPs that form pseudouridines in the peptidyl transferase center». *Mol Cell*, Vol. 11, n°2, p. 425-435.
- Kirwan, M. et I. Dokal. 2008. «Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces». *Clin Genet*, Vol. 73, n°2, p. 103-112.
- Kirwan, M. et I. Dokal. 2009. «Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres». *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1792, n°4, p. 371-379.
- Kirwan, M., T. Vulliamy, A. Marrone, A. J. Walne, R. Beswick, P. Hillmen, R. Kelly, A. Stewart, D. Bowen, S. O. Schonland, A. M. Whittle, A. McVerry, M. Gilleece et I. Dokal. 2009. «Defining the pathogenic role of telomerase mutations in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia». *Hum Mutat*, Vol. 30, n°11, p. 1567-1573.
- Kiss-Laszlo, Z., Y. Henry, J. P. Bachellerie, M. Caizergues-Ferrer et T. Kiss. 1996. «Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs». *Cell*, Vol. 85, n°7, p. 1077-1088.

- Kiss-Laszlo, Z., Y. Henry et T. Kiss. 1998. «Sequence and structural elements of methylation guide snoRNAs essential for site-specific ribose methylation of pre-rRNA». *EMBO J*, Vol. 17, n°3, p. 797-807.
- Kiss, A. M., B. E. Jady, E. Bertrand et T. Kiss. 2004. «Human box H/ACA pseudouridylation guide RNA machinery». *Mol Cell Biol*, Vol. 24, n°13, p. 5797-5807.
- Kiss, A. M., B. E. Jady, X. Darzacq, C. Verheggen, E. Bertrand et T. Kiss. 2002. «A Cajal body-specific pseudouridylation guide RNA is composed of two box H/ACA snoRNA-like domains». *Nucleic Acids Res*, Vol. 30, n°21, p. 4643-4649.
- Kiss, T. 2004. «Biogenesis of small nuclear RNPs». *J Cell Sci*, Vol. 117, n°Pt 25, p. 5949-5951.
- Kiss, T., E. Fayet, B. E. Jady, P. Richard et M. Weber. 2006. «Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs». *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, Vol. 71, p. 407-417.
- Klein, D. J., T. M. Schmeing, P. B. Moore et T. A. Steitz. 2001. «The kink-turn: a new RNA secondary structure motif». *EMBO J*, Vol. 20, n°15, p. 4214-4221.
- Knight, S., T. Vulliamy, A. Copplestone, E. Gluckman, P. Mason et I. Dokal. 1998. «Dyskeratosis Congenita (DC) Registry: identification of new features of DC». *Br J Haematol*, Vol. 103, n°4, p. 990-996.
- Knight, S. W., N. S. Heiss, T. J. Vulliamy, S. Greschner, G. Stavrides, G. S. Pai, G. Lestringant, N. Varma, P. J. Mason, I. Dokal et A. Poustka. 1999. «X-linked dyskeratosis congenita is predominantly caused by missense mutations in the DKC1 gene». *Am J Hum Genet*, Vol. 65, n°1, p. 50-58.
- Knight, S. W., T. J. Vulliamy, B. Morgan, K. Devriendt, P. J. Mason et I. Dokal. 2001. «Identification of novel DKC1 mutations in patients with dyskeratosis congenita: implications for pathophysiology and diagnosis». *Hum Genet*, Vol. 108, n°4, p. 299-303.
- Kohrmann, M., M. Luo, C. Kaether, L. DesGroseillers, C. G. Dotti et M. A. Kiebler. 1999. «Microtubule-dependent recruitment of Staufen-green fluorescent protein into large RNA-containing granules and subsequent dendritic transport in living hippocampal neurons». *Mol Biol Cell*, Vol. 10, n°9, p. 2945-2953.
- Kolodrubetz, D., W. Haggren et A. Burgum. 1988. «Amino-terminal sequence of a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear protein, NHP6, shows significant identity to bovine HMG1». *FEBS Lett*, Vol. 238, n°1, p. 175-179.



- Kong, L. B., A. C. Siva, V. A. Kickhoefer, L. H. Rome et P. L. Stewart. 2000. «RNA location and modeling of a WD40 repeat domain within the vault». *RNA*, Vol. 6, n°6, p. 890-900.
- Kong, L. B., A. C. Siva, L. H. Rome et P. L. Stewart. 1999. «Structure of the vault, a ubiquitous cellular component». *Structure*, Vol. 7, n°4, p. 371-379.
- Koonin, E. V. 1996. «Pseudouridine synthases: four families of enzymes containing a putative uridine-binding motif also conserved in dUTPases and dCTP deaminases». *Nucleic Acids Res*, Vol. 24, n°12, p. 2411-2415.
- Krishna, S. S., I. Majumdar et N. V. Grishin. 2003. «Structural classification of zinc fingers: survey and summary». *Nucleic Acids Res*, Vol. 31, n°2, p. 532-550.
- Kufel, J., C. Allmang, G. Chanfreau, E. Petfalski, D. L. Lafontaine et D. Tollervey. 2000. «Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding». *Mol Cell Biol*, Vol. 20, n°15, p. 5415-5424.
- Kuhn, J. F., E. J. Tran et E. S. Maxwell. 2002. «Archaeal ribosomal protein L7 is a functional homolog of the eukaryotic 15.5kD/Snu13p snoRNP core protein». *Nucleic Acids Res*, Vol. 30, n°4, p. 931-941.
- Kurilla, M. G. et J. D. Keene. 1983. «The leader RNA of vesicular stomatitis virus is bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies». *Cell*, Vol. 34, n°3, p. 837-845.
- LaBranche, H., S. Dupuis, Y. Ben-David, M. R. Bani, R. J. Wellinger et B. Chabot. 1998. «Telomere elongation by hnRNP A1 and a derivative that interacts with telomeric repeats and telomerase». *Nat Genet*, Vol. 19, n°2, p. 199-202.
- Lafontaine, D. L., C. Bousquet-Antonelli, Y. Henry, M. Caizergues-Ferrer et D. Tollervey. 1998. «The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase». *Genes Dev*, Vol. 12, n°4, p. 527-537.
- Lam, Y. W., L. Trinkle-Mulcahy et A. I. Lamond. 2005. «The nucleolus». *J Cell Sci*, Vol. 118, n°Pt 7, p. 1335-1337.
- Lansdorp, P. M., N. P. Verwoerd, F. M. van de Rijke, V. Dragowska, M. T. Little, R. W. Dirks, A. K. Raap et H. J. Tanke. 1996. «Heterogeneity in telomere length of human chromosomes». *Hum Mol Genet*, Vol. 5, n°5, p. 685-691.
- Le, S., R. Sternglanz et C. W. Greider. 2000. «Identification of two RNA-binding proteins associated with human telomerase RNA». *Mol Biol Cell*, Vol. 11, n°3, p. 999-1010.

- Lee, M. E., S. Y. Rha, H. C. Jeung, T. S. Kim, H. C. Chung et B. K. Oh. 2008. «Variation of the 3' telomeric overhang lengths in human cells». *Cancer Lett*, Vol. 264, n°1, p. 107-118.
- Lees-Miller, S. P. et K. Meek. 2003. «Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining». *Biochimie*, Vol. 85, n°11, p. 1161-1173.
- Lestrade, L. et M. J. Weber. 2006. «snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs». *Nucleic Acids Res*, Vol. 34, n°Database issue, p. D158-162.
- Leulliot, N., K. S. Godin, C. Hoareau-Aveilla, S. Quevillon-Cheruel, G. Varani, Y. Henry et H. Van Tilbeurgh. 2007. «The box H/ACA RNP assembly factor Naf1p contains a domain homologous to Gar1p mediating its interaction with Cbf5p». *J Mol Biol*, Vol. 371, n°5, p. 1338-1353.
- Li, H. D., J. Zagorski et M. J. Fournier. 1990. «Depletion of U14 small nuclear RNA (snR128) disrupts production of 18S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell Biol*, Vol. 10, n°3, p. 1145-1152.
- Li, L. et K. Ye. 2006. «Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle». *Nature*, Vol. 443, n°7109, p. 302-307.
- Liang, X. H., Q. Liu et M. J. Fournier. 2009. «Loss of rRNA modifications in the decoding center of the ribosome impairs translation and strongly delays pre-rRNA processing». *Rna*, Vol. 15, n°9, p. 1716-1728.
- Licciardo, P., S. Amente, L. Ruggiero, M. Monti, P. Pucci, L. Lania et B. Majello. 2003. «The FCP1 phosphatase interacts with RNA polymerase II and with MEP50 a component of the methylosome complex involved in the assembly of snRNP». *Nucleic Acids Res*, Vol. 31, n°3, p. 999-1005.
- Lin, C. H., H. M. Huang, M. Hsieh, K. M. Pollard et C. Li. 2002. «Arginine methylation of recombinant murine fibrillarin by protein arginine methyltransferase». *J Protein Chem*, Vol. 21, n°7, p. 447-453.
- Lindahl, L., R. H. Archer et J. M. Zengel. 1992. «A new rRNA processing mutant of *Saccharomyces cerevisiae*». *Nucleic Acids Res*, Vol. 20, n°2, p. 295-301.
- Liu, Q. et G. Dreyfuss. 1996. «A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein». *EMBO J*, Vol. 15, n°14, p. 3555-3565.
- Liu, Q., U. Fischer, F. Wang et G. Dreyfuss. 1997. «The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins». *Cell*, Vol. 90, n°6, p. 1013-1021.

- Liu, Y., B. E. Snow, M. P. Hande, G. Baerlocher, V. A. Kickhoefer, D. Yeung, A. Wakeham, A. Itie, D. P. Siderovski, P. M. Lansdorp, M. O. Robinson et L. Harrington. 2000. «Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo». *Mol Cell Biol*, Vol. 20, n°21, p. 8178-8184.
- Loyer, P., J. H. Trembley, J. A. Grenet, A. Busson, A. Corlu, W. Zhao, M. Kocak, V. J. Kidd et J. M. Lahti. 2008. «Characterization of cyclin L1 and L2 interactions with CDK11 and splicing factors: influence of cyclin L isoforms on splice site selection». *J Biol Chem*, Vol. 283, n°12, p. 7721-7732.
- Luhrmann, R. 1990. «Functions of U-snRNPs». *Mol Biol Rep*, Vol. 14, n°2-3, p. 183-192.
- Luhrmann, R., B. Kastner et M. Bach. 1990. «Structure of spliceosomal snRNPs and their role in pre-mRNA splicing». *Biochim Biophys Acta*, Vol. 1087, n°3, p. 265-292.
- Lukowiak, A. A., A. Narayanan, Z. H. Li, R. M. Terns et M. P. Terns. 2001. «The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus». *Rna*, Vol. 7, n°12, p. 1833-1844.
- Luo, M., T. F. Duchaine et L. DesGroseillers. 2002. «Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association». *Biochem J*, Vol. 365, n°Pt 3, p. 817-824.
- Ly, H., R. T. Calado, P. Allard, G. M. Baerlocher, P. M. Lansdorp, N. S. Young et T. G. Parslow. 2005. «Functional characterization of telomerase RNA variants found in patients with hematologic disorders». *Blood*, Vol. 105, n°6, p. 2332-2339.
- Ly, H., L. Xu, M. A. Rivera, T. G. Parslow et E. H. Blackburn. 2003. «A role for a novel 'trans-pseudoknot' RNA-RNA interaction in the functional dimerization of human telomerase». *Genes Dev*, Vol. 17, n°9, p. 1078-1083.
- Macrae, I. J. et J. A. Doudna. 2005. «Ro's role in RNA reconnaissance». *Cell*, Vol. 121, n°4, p. 495-496.
- Madore, S. J., E. D. Wieben et T. Pederson. 1984. «Eukaryotic small ribonucleoproteins. Anti-La human autoantibodies react with U1 RNA-protein complexes». *J Biol Chem*, Vol. 259, n°3, p. 1929-1933.
- Maraia, R. J. et R. V. Intine. 2001. «Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function». *Mol Cell Biol*, Vol. 21, n°2, p. 367-379.
- Maroney, P. A., S. Chamnongpol, F. Souret et T. W. Nilsen. 2007. «A rapid, quantitative assay for direct detection of microRNAs and other small RNAs using splinted ligation». *RNA*, Vol. 13, n°6, p. 930-936.

- Marrone, A. et P. J. Mason. 2003. «Dyskeratosis congenita». *Cell Mol Life Sci*, Vol. 60, n°3, p. 507-517.
- Marrone, A., D. Stevens, T. Vulliamy, I. Dokal et P. J. Mason. 2004. «Heterozygous telomerase RNA mutations found in dyskeratosis congenita and aplastic anemia reduce telomerase activity via haploinsufficiency». *Blood*, Vol. 104, n°13, p. 3936-3942.
- Marrone, A., A. Walne et I. Dokal. 2005. «Dyskeratosis congenita: telomerase, telomeres and anticipation». *Curr Opin Genet Dev*, Vol. 15, n°3, p. 249-257.
- Massenet, S., I. Ansmant, Y. Motorin et C. Branlant. 1999. «The first determination of pseudouridine residues in 23S ribosomal RNA from hyperthermophilic Archaea *Sulfolobus acidocaldarius*». *FEBS Lett*, Vol. 462, n°1-2, p. 94-100.
- Matera, A. G., R. M. Terns et M. P. Terns. 2007. «Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs». *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 8, n°3, p. 209-220.
- Maxwell, E. S. et M. J. Fournier. 1995. «The small nucleolar RNAs». *Annu Rev Biochem*, Vol. 64, p. 897-934.
- Meier, U. T. 2005. «The many facets of H/ACA ribonucleoproteins». *Chromosoma*, Vol. 114, n°1, p. 1-14.
- Meier, U. T. et G. Blobel. 1992. «Nopp140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm». *Cell*, Vol. 70, n°1, p. 127-138.
- Meier, U. T. et G. Blobel. 1994. «NAP57, a mammalian nucleolar protein with a putative homolog in yeast and bacteria». *J Cell Biol*, Vol. 127, n°6 Pt 1, p. 1505-1514.
- Meister, G., D. Buhler, R. Pillai, F. Lottspeich et U. Fischer. 2001. «A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs». *Nat Cell Biol*, Vol. 3, n°11, p. 945-949.
- Meister, G., C. Eggert et U. Fischer. 2002. «SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story». *Trends Cell Biol*, Vol. 12, n°10, p. 472-478.
- Miles, J. R., T. G. McDaniel, R. T. Wiedmann, R. A. Cushman, S. E. Echternkamp, J. L. Vallet et T. P. Smith. 2009. «174 MicroRNA EXPRESSION PROFILE IN BOVINE CUMULUS-OOCYTE COMPLEXES DURING LATE OOGENESIS». *Reprod Fertil Dev*, Vol. 21, n°1, p. 186.
- Mitchell, J. R., J. Cheng et K. Collins. 1999. «A box H/ACA small nucleolar RNA-like domain at the human telomerase RNA 3' end». *Mol Cell Biol*, Vol. 19, n°1, p. 567-576.

- Mitchell, J. R. et K. Collins. 2000. «Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase». *Mol Cell*, Vol. 6, n°2, p. 361-371.
- Mochizuki, Y., J. He, S. Kulkarni, M. Bessler et P. J. Mason. 2004. «Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 101, n°29, p. 10756-10761.
- Mollenbeck, M., J. Postberg, K. Paeschke, M. Rossbach, F. Jonsson et H. J. Lipps. 2003. «The telomerase-associated protein p43 is involved in anchoring telomerase in the nucleus». *J Cell Sci*, Vol. 116, n°Pt 9, p. 1757-1761.
- Moran-Jones, K., L. Wayman, D. D. Kennedy, R. R. Reddel, S. Sara, M. J. Snee et R. Smith. 2005. «hnRNP A2, a potential ssDNA/RNA molecular adapter at the telomere». *Nucleic Acids Res*, Vol. 33, n°2, p. 486-496.
- Moriarty, T. J., D. T. Marie-Egyptienne et C. Autexier. 2004. «Functional organization of repeat addition processivity and DNA synthesis determinants in the human telomerase multimer». *Mol Cell Biol*, Vol. 24, n°9, p. 3720-3733.
- Morlando, M., M. Ballarino, P. Greco, E. Caffarelli, B. Dichtl et I. Bozzoni. 2004. «Coupling between snoRNP assembly and 3' processing controls box C/D snoRNA biosynthesis in yeast». *EMBO J*, Vol. 23, n°12, p. 2392-2401.
- Morrissey, J. P. et D. Tollervey. 1993. «Yeast snR30 is a small nucleolar RNA required for 18S rRNA synthesis». *Mol Cell Biol*, Vol. 13, n°4, p. 2469-2477.
- Moyzis, R. K., J. M. Buckingham, L. S. Cram, M. Dani, L. L. Deaven, M. D. Jones, J. Meyne, R. L. Ratliff et J. R. Wu. 1988. «A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)<sub>n</sub>, present at the telomeres of human chromosomes». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 85, n°18, p. 6622-6626.
- Nakao, A., M. Yoshihama et N. Kenmochi. 2004. «RPG: the Ribosomal Protein Gene database». *Nucleic Acids Res*, Vol. 32, n°Database issue, p. D168-170.
- Narayanan, A., A. Lukowiak, B. E. Jady, F. Dragon, T. Kiss, R. M. Terns et M. P. Terns. 1999. «Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs». *EMBO J*, Vol. 18, n°18, p. 5120-5130.
- Newman, D. R., J. F. Kuhn, G. M. Shanab et E. S. Maxwell. 2000. «Box C/D snoRNA-associated proteins: two pairs of evolutionarily ancient proteins and possible links to replication and transcription». *RNA*, Vol. 6, n°6, p. 861-879.
- Nguyen, B. N., L. W. Elmore et S. E. Holt. 2009. «Mechanism of dominant-negative telomerase function». *Cell Cycle*, Vol. 8, n°19, p. 3227-3233.

- Ni, J., A. L. Tien et M. J. Fournier. 1997. «Small nucleolar RNAs direct site-specific synthesis of pseudouridine in ribosomal RNA». *Cell*, Vol. 89, n°4, p. 565-573.
- Nicoloso, M., L. H. Qu, B. Michot et J. P. Bachellerie. 1996. «Intron-encoded, antisense small nucleolar RNAs: the characterization of nine novel species points to their direct role as guides for the 2'-O-ribose methylation of rRNAs». *J Mol Biol*, Vol. 260, n°2, p. 178-195.
- Normand, C., R. Capeyrou, S. Quevillon-Cheruel, A. Mougin, Y. Henry et M. Caizergues-Ferrer. 2006. «Analysis of the binding of the N-terminal conserved domain of yeast Cbf5p to a box H/ACA snoRNA». *Rna*, Vol. 12, n°10, p. 1868-1882.
- Nottrott, S., K. Hartmuth, P. Fabrizio, H. Urlaub, I. Vidovic, R. Ficner et R. Luhrmann. 1999. «Functional interaction of a novel 15.5kD[U4/U6.U5] tri-snRNP protein with the 5' stem-loop of U4 snRNA». *EMBO J*, Vol. 18, n°21, p. 6119-6133.
- Ochs, R. L., M. A. Lischwe, W. H. Spohn et H. Busch. 1985. «Fibrillarin: a new protein of the nucleolus identified by autoimmune sera». *Biol Cell*, Vol. 54, n°2, p. 123-133.
- Oeseburg, H., R. A. de Boer, W. H. van Gilst et P. van der Harst. 2009. «Telomere biology in healthy aging and disease». *Pflugers Arch*, p.
- Olovnikov, A. M. 1973. «A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon». *J Theor Biol*, Vol. 41, n°1, p. 181-190.
- Omer, A. D., T. M. Lowe, A. G. Russell, H. Ebhardt, S. R. Eddy et P. P. Dennis. 2000. «Homologs of small nucleolar RNAs in Archaea». *Science*, Vol. 288, n°5465, p. 517-522.
- Omer, A. D., S. Ziesche, H. Ebhardt et P. P. Dennis. 2002. «In vitro reconstitution and activity of a C/D box methylation guide ribonucleoprotein complex». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 99, n°8, p. 5289-5294.
- Ortmann, C. A., C. M. Niemeyer, A. Wawer, W. Ebell, I. Baumann et C. P. Kratz. 2006. «TERC mutations in children with refractory cytopenia». *Haematologica*, Vol. 91, n°5, p. 707-708.
- Palm, W. et T. de Lange. 2008. «How shelterin protects mammalian telomeres». *Annu Rev Genet*, Vol. 42, p. 301-334.
- Paushkin, S., A. K. Gubitz, S. Massenet et G. Dreyfuss. 2002. «The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins». *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 14, n°3, p. 305-312.
- Peculis, B. A. 1997. «The sequence of the 5' end of the U8 small nucleolar RNA is critical for 5.8S and 28S rRNA maturation». *Mol Cell Biol*, Vol. 17, n°7, p. 3702-3713.

- Peculis, B. A. et J. A. Steitz. 1993. «Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte». *Cell*, Vol. 73, n°6, p. 1233-1245.
- Pellizzoni, L., J. Baccon, B. Charroux et G. Dreyfuss. 2001. «The survival of motor neurons (SMN) protein interacts with the snoRNP proteins fibrillarin and GAR1». *Curr Biol*, Vol. 11, n°14, p. 1079-1088.
- Pellizzoni, L., J. Baccon, J. Rappsilber, M. Mann et G. Dreyfuss. 2002. «Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°9, p. 7540-7545.
- Pellizzoni, L., J. Yong et G. Dreyfuss. 2002. «Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly». *Science*, Vol. 298, n°5599, p. 1775-1779.
- Peng, W. T., M. D. Robinson, S. Mnaimneh, N. J. Krogan, G. Cagney, Q. Morris, A. P. Davierwala, J. Grigull, X. Yang, W. Zhang, N. Mitsakakis, O. W. Ryan, N. Datta, V. Jojic, C. Pal, V. Canadien, D. Richards, B. Beattie, L. F. Wu, S. J. Altschuler, S. Roweis, B. J. Frey, A. Emili, J. F. Greenblatt et T. R. Hughes. 2003. «A panoramic view of yeast noncoding RNA processing». *Cell*, Vol. 113, n°7, p. 919-933.
- Piekna-Przybylska, D., W. A. Decatur et M. J. Fournier. 2007. «New bioinformatic tools for analysis of nucleotide modifications in eukaryotic rRNA». *RNA*, Vol. 13, n°3, p. 305-312.
- Pogacic, V., F. Dragon et W. Filipowicz. 2000. «Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10». *Mol Cell Biol*, Vol. 20, n°23, p. 9028-9040.
- Pollard, K. M., G. Reimer et E. M. Tan. 1989. «Autoantibodies in scleroderma». *Clin Exp Rheumatol*, Vol. 7 Suppl 3, p. S57-62.
- Rashid, R., M. Aittaleb, Q. Chen, K. Spiegel, B. Demeler et H. Li. 2003. «Functional requirement for symmetric assembly of archaeal box C/D small ribonucleoprotein particles». *J Mol Biol*, Vol. 333, n°2, p. 295-306.
- Rashid, R., B. Liang, D. L. Baker, O. A. Youssef, Y. He, K. Phipps, R. M. Terns, M. P. Terns et H. Li. 2006. «Crystal structure of a Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications in RNA-guided pseudouridylation and dyskeratosis congenita». *Mol Cell*, Vol. 21, n°2, p. 249-260.
- Reichow, S. L., T. Hamma, A. R. Ferre-D'Amare et G. Varani. 2007. «The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins». *Nucleic Acids Res*, Vol. 35, n°5, p. 1452-1464.
- Reichow, S. L. et G. Varani. 2008. «Nop10 is a conserved H/ACA snoRNP molecular adaptor». *Biochemistry*, Vol. 47, n°23, p. 6148-6156.

- Reimer, G., V. D. Steen, C. A. Penning, T. A. Medsger, Jr. et E. M. Tan. 1988. «Correlates between autoantibodies to nucleolar antigens and clinical features in patients with systemic sclerosis (scleroderma)». *Arthritis Rheum*, Vol. 31, n°4, p. 525-532.
- Ren, X., G. Gavory, H. Li, L. Ying, D. Klennerman et S. Balasubramanian. 2003. «Identification of a new RNA:RNA interaction site for human telomerase RNA (hTR): structural implications for hTR accumulation and a dyskeratosis congenita point mutation». *Nucleic Acids Res*, Vol. 31, n°22, p. 6509-6515.
- Richard, P., X. Darzacq, E. Bertrand, B. E. Jady, C. Verheggen et T. Kiss. 2003. «A common sequence motif determines the Cajal body-specific localization of box H/ACA scaRNAs». *EMBO J*, Vol. 22, n°16, p. 4283-4293.
- Richard, P., A. M. Kiss, X. Darzacq et T. Kiss. 2006. «Cotranscriptional recognition of human intronic box H/ACA snoRNAs occurs in a splicing-independent manner». *Mol Cell Biol*, Vol. 26, n°7, p. 2540-2549.
- Royle, N. J., A. Mendez-Bermudez, A. Gravani, C. Novo, J. Foxon, J. Williams, V. Cotton et A. Hidalgo. 2009. «The role of recombination in telomere length maintenance». *Biochem Soc Trans*, Vol. 37, n°Pt 3, p. 589-595.
- Rozhdestvensky, T. S., T. H. Tang, I. V. Tchirkova, J. Brosius, J. P. Bachellerie et A. Hüttenhofer. 2003. «Binding of L7Ae protein to the K-turn of archaeal snoRNAs: a shared RNA binding motif for C/D and H/ACA box snoRNAs in Archaea». *Nucleic Acids Res*, Vol. 31, n°3, p. 869-877.
- Ruggero, D., S. Grisendi, F. Piazza, E. Rego, F. Mari, P. H. Rao, C. Cordon-Cardo et P. P. Pandolfi. 2003. «Dyskeratosis congenita and cancer in mice deficient in ribosomal RNA modification». *Science*, Vol. 299, n°5604, p. 259-262.
- Savage, S. A. et B. P. Alter. 2009. «Dyskeratosis congenita». *Hematol Oncol Clin North Am*, Vol. 23, n°2, p. 215-231.
- Savage, S. A., N. Giri, G. M. Baerlocher, N. Orr, P. M. Lansdorp et B. P. Alter. 2008. «TINF2, a component of the shelterin telomere protection complex, is mutated in dyskeratosis congenita». *Am J Hum Genet*, Vol. 82, n°2, p. 501-509.
- Schimmang, T., D. Tollervy, H. Kern, R. Frank et E. C. Hurt. 1989. «A yeast nucleolar protein related to mammalian fibrillarin is associated with small nucleolar RNA and is essential for viability». *EMBO J*, Vol. 8, n°13, p. 4015-4024.
- Schlutzen, F., A. Tocilj, R. Zarivach, J. Harms, M. Gluehmann, D. Janell, A. Bashan, H. Bartels, I. Agmon, F. Franceschi et A. Yonath. 2000. «Structure of functionally activated small ribosomal subunit at 3.3 angstroms resolution». *Cell*, Vol. 102, n°5, p. 615-623.



- Schmitt, M. E. et D. A. Clayton. 1993. «Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*». *Mol Cell Biol*, Vol. 13, n°12, p. 7935-7941.
- Sfeir, A. J., W. Chai, J. W. Shay et W. E. Wright. 2005. «Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes». *Mol Cell*, Vol. 18, n°1, p. 131-138.
- Shay, J. W., S. A. Bacchetti. 1997. «Survey of telomerase activity in human cancer». *Eur J Can*, Vol. 33, n°5, p. 787-791.
- Shay, J. W. et W. E. Wright. 2000. «Hayflick, his limit, and cellular ageing». *Nat Rev Mol Cell Biol*, Vol. 1, n°1, p. 72-76.
- Shore, D. et A. Bianchi. 2009. «Telomere length regulation: coupling DNA end processing to feedback regulation of telomerase». *EMBO J*, Vol. 28, n°16, p. 2309-2322.
- Shuai, K. et J. R. Warner. 1991. «A temperature sensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective in pre-rRNA processing». *Nucleic Acids Res*, Vol. 19, n°18, p. 5059-5064.
- Singh, M., F. A. Gonzales, D. Cascio, N. Heckmann, G. Chanfreau et J. Feigon. 2009. «Structure and functional studies of the CS domain of the essential H/ACA ribonucleoparticle assembly protein SHQ1». *J Biol Chem*, Vol. 284, n°3, p. 1906-1916.
- Song, K., D. Jung, Y. Jung, S. G. Lee et I. Lee. 2000. «Interaction of human Ku70 with TRF2». *FEBS Lett*, Vol. 481, n°1, p. 81-85.
- Speckmann, W. A., Z. H. Li, T. M. Lowe, S. R. Eddy, R. M. Terns et M. P. Terns. 2002. «Archaeal guide RNAs function in rRNA modification in the eukaryotic nucleus». *Curr Biol*, Vol. 12, n°3, p. 199-203.
- Steiner, E., K. Holzmann, L. Elbling, M. Micksche et W. Berger. 2006. «Cellular functions of vaults and their involvement in multidrug resistance». *Curr Drug Targets*, Vol. 7, n°8, p. 923-934.
- Stephen, A. G., S. Raval-Fernandes, T. Huynh, M. Torres, V. A. Kickhoefer et L. H. Rome. 2001. «Assembly of vault-like particles in insect cells expressing only the major vault protein». *J Biol Chem*, Vol. 276, n°26, p. 23217-23220.
- Stewart, S. A., I. Ben-Porath, V. J. Carey, B. F. O'Connor, W. C. Hahn et R. A. Weinberg. 2003. «Erosion of the telomeric single-strand overhang at replicative senescence». *Nat Genet*, Vol. 33, n°4, p. 492-496.

- Strubin, M., J. W. Newell et P. Matthias. 1995. «OBF-1, a novel B cell-specific coactivator that stimulates immunoglobulin promoter activity through association with octamer-binding proteins». *Cell*, Vol. 80, n°3, p. 497-506.
- Szewczak, L. B., S. J. DeGregorio, S. A. Strobel et J. A. Steitz. 2002. «Exclusive interaction of the 15.5 kD protein with the terminal box C/D motif of a methylation guide snoRNP». *Chem Biol*, Vol. 9, n°10, p. 1095-1107.
- Takai, H., A. Smogorzewska et T. de Lange. 2003. «DNA damage foci at dysfunctional telomeres». *Curr Biol*, Vol. 13, n°17, p. 1549-1556.
- TenHarmsel, A. 2004. «TNT\_ rabbit reticulocyte lysate systems-Easy protein expression». *Promega Notes*, Vol. 88, p. 24-26.
- Tesmer, V. M., L. P. Ford, S. E. Holt, B. C. Frank, X. Yi, D. L. Aisner, M. Ouellette, J. W. Shay et W. E. Wright. 1999. «Two inactive fragments of the integral RNA cooperate to assemble active telomerase with the human protein catalytic subunit (hTERT) in vitro». *Mol Cell Biol*, Vol. 19, n°9, p. 6207-6216.
- Theimer, C. A. et J. Feigon. 2006. «Structure and function of telomerase RNA». *Curr Opin Struct Biol*, Vol. 16, n°3, p. 307-318.
- Theimer, C. A., L. D. Finger, L. Trantirek et J. Feigon. 2003. «Mutations linked to dyskeratosis congenita cause changes in the structural equilibrium in telomerase RNA». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 100, n°2, p. 449-454.
- Theimer, C. A., B. E. Jady, N. Chim, P. Richard, K. E. Breece, T. Kiss et J. Feigon. 2007. «Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals». *Mol Cell*, Vol. 27, n°6, p. 869-881.
- Tollervey, D. et T. Kiss. 1997. «Function and synthesis of small nucleolar RNAs». *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 9, n°3, p. 337-342.
- Tollervey, D., H. Lehtonen, R. Jansen, H. Kern et E. C. Hurt. 1993. «Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly». *Cell*, Vol. 72, n°3, p. 443-457.
- Trahan, C. et F. Dragon. 2009. «Dyskeratosis congenita mutations in the H/ACA domain of human telomerase RNA affect its assembly into a pre-RNP». *Rna*, Vol. 15, n°2, p. 235-243.
- Trahan, C., C. Martel et F. Dragon. 2010. «Effects of dyskeratosis congenita mutations in dyskerin, NHP2 and NOP10 on assembly of H/ACA pre-RNPs». *Hum Mol Genet*, doi:10.1093/hmg/ddp551

- Tran, E. J., X. Zhang et E. S. Maxwell. 2003. «Efficient RNA 2'-O-methylation requires juxtaposed and symmetrically assembled archaeal box C/D and C'/D' RNPs». *EMBO J*, Vol. 22, n°15, p. 3930-3940.
- Tyc, K. et J. A. Steitz. 1989. «U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus». *EMBO J*, Vol. 8, n°10, p. 3113-3119.
- Tycowski, K. T., M. D. Shu, A. Kukoyi et J. A. Steitz. 2009. «A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles». *Mol Cell*, Vol. 34, n°1, p. 47-57.
- Venteicher, A. S., E. B. Abreu, Z. Meng, K. E. McCann, R. M. Terns, T. D. Veenstra, M. P. Terns et S. E. Artandi. 2009. «A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis». *Science*, Vol. 323, n°5914, p. 644-648.
- Venteicher, A. S., Z. Meng, P. J. Mason, T. D. Veenstra et S. E. Artandi. 2008. «Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly». *Cell*, Vol. 132, n°6, p. 945-957.
- Verdun, R. E. et J. Karlseder. 2007. «Replication and protection of telomeres». *Nature*, Vol. 447, n°7147, p. 924-931.
- Vidovic, I., S. Nottrott, K. Hartmuth, R. Luhrmann et R. Ficner. 2000. «Crystal structure of the spliceosomal 15.5kD protein bound to a U4 snRNA fragment». *Mol Cell*, Vol. 6, n°6, p. 1331-1342.
- von Zglinicki, T., G. Saretzki, J. Ladhoff, F. d'Adda di Fagagna et S. P. Jackson. 2005. «Human cell senescence as a DNA damage response». *Mech Ageing Dev*, Vol. 126, n°1, p. 111-117.
- Vulliamy, T., R. Beswick, M. Kirwan, A. Marrone, M. Digweed, A. Walne et I. Dokal. 2008. «Mutations in the telomerase component NHP2 cause the premature ageing syndrome dyskeratosis congenita». *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 105, n°23, p. 8073-8078.
- Vulliamy, T., A. Marrone, I. Dokal et P. J. Mason. 2002. «Association between aplastic anaemia and mutations in telomerase RNA». *Lancet*, Vol. 359, n°9324, p. 2168-2170.
- Vulliamy, T., A. Marrone, F. Goldman, A. Dearlove, M. Bessler, P. J. Mason et I. Dokal. 2001. «The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita». *Nature*, Vol. 413, n°6854, p. 432-435.
- Vulliamy, T., A. Marrone, R. Szydlo, A. Walne, P. J. Mason et I. Dokal. 2004. «Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with

- dyskeratosis congenita due to mutations in TERC». *Nat Genet*, Vol. 36, n°5, p. 447-449.
- Vulliamy, T. J. et I. Dokal. 2008. «Dyskeratosis congenita: the diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex». *Biochimie*, Vol. 90, n°1, p. 122-130.
- Vulliamy, T. J., A. Marrone, S. W. Knight, A. Walne, P. J. Mason et I. Dokal. 2006. «Mutations in dyskeratosis congenita: their impact on telomere length and the diversity of clinical presentation». *Blood*, Vol. 107, n°7, p. 2680-2685.
- Walker, S. C. et D. R. Engelke. 2006. «Ribonuclease P: the evolution of an ancient RNA enzyme». *Crit Rev Biochem Mol Biol*, Vol. 41, n°2, p. 77-102.
- Walne, A. J. et I. Dokal. 2009. «Advances in the understanding of dyskeratosis congenita». *Br J Haematol*, Vol. 145, n°2, p. 164-172.
- Walne, A. J., T. Vulliamy, R. Beswick, M. Kirwan et I. Dokal. 2008. «TINF2 mutations result in very short telomeres: analysis of a large cohort of patients with dyskeratosis congenita and related bone marrow failure syndromes». *Blood*, Vol. 112, n°9, p. 3594-3600.
- Walne, A. J., T. Vulliamy, A. Marrone, R. Beswick, M. Kirwan, Y. Masunari, F. H. Al-Qurashi, M. Aljurf et I. Dokal. 2007. «Genetic heterogeneity in autosomal recessive dyskeratosis congenita with one subtype due to mutations in the telomerase-associated protein NOP10». *Hum Mol Genet*, Vol. 16, n°13, p. 1619-1629.
- Wang, C. et U. T. Meier. 2004. «Architecture and assembly of mammalian H/ACA small nucleolar and telomerase ribonucleoproteins». *EMBO J*, Vol. 23, n°8, p. 1857-1867.
- Wang, C., C. C. Query et U. T. Meier. 2002. «Immunopurified small nucleolar ribonucleoprotein particles pseudouridylylate rRNA independently of their association with phosphorylated Nopp140». *Mol Cell Biol*, Vol. 22, n°24, p. 8457-8466.
- Wang, H., D. Boisvert, K. K. Kim, R. Kim et S. H. Kim. 2000. «Crystal structure of a fibrillarin homologue from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.6 Å resolution». *EMBO J*, Vol. 19, n°3, p. 317-323.
- Watanabe, Y. et M. W. Gray. 2000. «Evolutionary appearance of genes encoding proteins associated with box H/ACA snoRNAs: cbf5p in *Euglena gracilis*, an early diverging eukaryote, and candidate Gar1p and Nop10p homologs in archaeobacteria». *Nucleic Acids Res*, Vol. 28, n°12, p. 2342-2352.
- Watkins, N. J., A. Dickmanns et R. Luhrmann. 2002. «Conserved stem II of the box C/D motif is essential for nucleolar localization and is required, along with the 15.5K protein, for the hierarchical assembly of the box C/D snoRNP». *Mol Cell Biol*, Vol. 22, n°23, p. 8342-8352.

- Watkins, N. J., A. Gottschalk, G. Neubauer, B. Kastner, P. Fabrizio, M. Mann et R. Luhrmann. 1998. «Cbf5p, a potential pseudouridine synthase, and Nhp2p, a putative RNA-binding protein, are present together with Gar1p in all H BOX/ACA-motif snoRNPs and constitute a common bipartite structure». *RNA*, Vol. 4, n°12, p. 1549-1568.
- Watkins, N. J., I. Lemm, D. Ingelfinger, C. Schneider, M. Hossbach, H. Urlaub et R. Luhrmann. 2004. «Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex». *Mol Cell*, Vol. 16, n°5, p. 789-798.
- Watkins, N. J., V. Segault, B. Charpentier, S. Nottrott, P. Fabrizio, A. Bachi, M. Wilm, M. Rosbash, C. Branlant et R. Luhrmann. 2000. «A common core RNP structure shared between the small nucleolar box C/D RNPs and the spliceosomal U4 snRNP». *Cell*, Vol. 103, n°3, p. 457-466.
- Weinrich, S. L., R. Pruzan, L. Ma, M. Ouellette, V. M. Tesmer, S. E. Holt, A. G. Bodnar, S. Lichtsteiner, N. W. Kim, J. B. Trager, R. D. Taylor, R. Carlos, W. H. Andrews, W. E. Wright, J. W. Shay, C. B. Harley et G. B. Morin. 1997. «Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT». *Nat Genet*, Vol. 17, n°4, p. 498-502.
- Weinstein, L. B. et J. A. Steitz. 1999. «Guided tours: from precursor snoRNA to functional snoRNP». *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 11, n°3, p. 378-384.
- Wenz, C., B. Enenkel, M. Amacker, C. Kelleher, K. Damm et J. Lingner. 2001. «Human telomerase contains two cooperating telomerase RNA molecules». *EMBO J*, Vol. 20, n°13, p. 3526-3534.
- Whitehead, S. E., K. W. Jones, X. Zhang, X. Cheng, R. M. Terns et M. P. Terns. 2002. «Determinants of the interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the dimethylarginine-modified box H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein GAR1». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°50, p. 48087-48093.
- Will, C. L. et R. Luhrmann. 2001. «Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function». *Curr Opin Cell Biol*, Vol. 13, n°3, p. 290-301.
- Wolin, S. L. et T. Cedervall. 2002. «The La protein». *Annu Rev Biochem*, Vol. 71, p. 375-403.
- Wu, S., J. Skolnick et Y. Zhang. 2007. «Ab initio modeling of small proteins by iterative TASSER simulations». *BMC Biol*, Vol. 5, p. 17.
- Wyatt, H. D., D. A. Lobb et T. L. Beattie. 2007. «Characterization of physical and functional anchor site interactions in human telomerase». *Mol Cell Biol*, Vol. 27, n°8, p. 3226-3240.

- Xin, H., D. Liu et Z. Songyang. 2008. «The telosome/shelterin complex and its functions». *Genome Biol*, Vol. 9, n°9, p. 232.
- Xu, C., P. A. Henry, A. Setya et M. F. Henry. 2003. «In vivo analysis of nucleolar proteins modified by the yeast arginine methyltransferase Hmt1/Rmt1p». *RNA*, Vol. 9, n°6, p. 746-759.
- Xue, D., D. A. Robinson, B. K. Pannone, C. J. Yoo et S. L. Wolin. 2000. «U snRNP assembly in yeast involves the La protein». *EMBO J*, Vol. 19, n°7, p. 1650-1660.
- Yang, P. K., C. Hoareau, C. Froment, B. Monsarrat, Y. Henry et G. Chanfreau. 2005. «Cotranscriptional recruitment of the pseudouridylsynthetase Cbf5p and of the RNA binding protein Naf1p during H/ACA snoRNP assembly». *Mol Cell Biol*, Vol. 25, n°8, p. 3295-3304.
- Yang, P. K., G. Rotondo, T. Porras, P. Legrain et G. Chanfreau. 2002. «The Shq1p.Naf1p complex is required for box H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein particle biogenesis». *J Biol Chem*, Vol. 277, n°47, p. 45235-45242.
- Yang, Y., C. Isaac, C. Wang, F. Dragon, V. Pogacic et U. T. Meier. 2000. «Conserved composition of mammalian box H/ACA and box C/D small nucleolar ribonucleoprotein particles and their interaction with the common factor Nopp140». *Mol Biol Cell*, Vol. 11, n°2, p. 567-577.
- Youssoufian, H., V. Gharibyan et M. Qatanani. 1999. «Analysis of epitope-tagged forms of the dyskeratosis congenital protein (dyskerin): identification of a nuclear localization signal». *Blood Cells Mol Dis*, Vol. 25, n°5-6, p. 305-309.
- Yu, Y. T., M. D. Shu et J. A. Steitz. 1998. «Modifications of U2 snRNA are required for snRNP assembly and pre-mRNA splicing». *EMBO J*, Vol. 17, n°19, p. 5783-5795.
- Yun, X., Y. Wu, L. Yao, H. Zong, Y. Hong, J. Jiang, J. Yang, Z. Zhang et J. Gu. 2007. «CDK11(p58) protein kinase activity is associated with Bcl-2 down-regulation in pro-apoptosis pathway». *Mol Cell Biochem*, Vol. 304, n°1-2, p. 213-218.
- Zaug, A. J., J. Linger et T. R. Cech. 1996. «Method for determining RNA 3' ends and application to human telomerase RNA». *Nucleic Acids Res*, Vol. 24, n°3, p. 532-533.
- Zhang, Y. 2007. «Template-based modeling and free modeling by I-TASSER in CASP7». *Proteins*, Vol. 69 Suppl 8, p. 108-117.
- Zhang, Y. 2008. «I-TASSER server for protein 3D structure prediction». *BMC Bioinformatics*, Vol. 9, p. 40.

Zhao, X. et Y. T. Yu. 2004. «Pseudouridines in and near the branch site recognition region of U2 snRNA are required for snRNP biogenesis and pre-mRNA splicing in *Xenopus* oocytes». *Rna*, Vol. 10, n°4, p. 681-690.